



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Συγκριτική πειραματική μελέτη της δράσης τετρακυκλινών σε ρυθμιστικούς και προφλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς ασθενών με Σκλήρυνση κατά πλάκας

Φλώρου Δέσποινα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Δαρδιώτης Ευθύμιος, (Επιβλέπων Καθηγητής) Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Ειδική Μονάδα Νευροεπιστημών (Νευρολογική Κλινική).

Λάρισα, Οκτώβριος, 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

Comparative experimental study of tetracycline action in regulatory and proinflammatory cell populations of patients with multiple sclerosis

By

Florou Despoina

Three-member committee:

- Dardiotis Efthimios, Assistant Professor of Neurology, supervisor
- Bogdanos Dimitrios, Associate Professor of Pathology and Autoimmune Diseases
- Germenis Anastasios, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine in the Department of Neurology

Larisa, October, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	12
3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	13
4 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	16
5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	18
6 ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	21
7 ΠΡΟΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	26
7.1 Th1.....	26
7.2 Th17.....	27
7.3 IL-18	28
7.4 IL-12	28
7.5 IFN-γ.....	29
7.6 IL-17	30
7.7 Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	30
7.8 NK ΚΑΙ NKT ΚΥΤΤΑΡΑ	31
8 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ.....	32
8.1 Tregs	32
8.2 Bregs.....	34
9 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ.....	35
9.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ	36
9.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	38
9.3 ΤΡΟΠΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ	40
9.4 ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ	42
9.5 ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΚΠ.....	48
10 ΣΚΟΠΟΣ.....	49
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
11 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
11.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	51
11.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBMCs)	52
11.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ TRYPAN BLUE.....	53
11.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ PBMCs	54

11.5	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ	55
11.6	ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	56
11.7	ΕΠΩΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ.....	57
11.8	ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	60
12	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	62
13	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	92
14	ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Ανοσολογικό Εργαστήριο της Ρευματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας σε συνεργασία με την Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος: «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Στόχος της μελέτης ήταν να ερευνήσει και να συγκρίνει την χρησιμότητα δύο τετρακυκλινών και τις επιδράσεις τους *in vitro* ως θεραπευτικά μέσα στην Σκλήρυνση κατά Πλάκας. Το Γενικό μέρος της μελέτης επιχειρεί σε μια σφαιρική προσέγγιση της νόσου καθώς και των φαρμακευτικών παραγόντων που εξετάστηκαν, ώστε ο αναγνώστης να κατανοήσει πλήρως την Σκλήρυνση κατά πλάκας καθώς και τους λόγους, οι οποίοι έθεσαν στο ερευνητικό μας επίκεντρο τις τετρακυκλίνες.

Με το πέρας της μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Δαρδιώτη Ευθύμιο, Επίκουρο καθηγητή Νευρολογίας και διευθυντή της Νευρολογικής Κλινικής για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υποστήριξη καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπόγδανο Δημήτριο, Αναπληρωτή καθηγητή και διευθυντή της Ρευματολογικής Κλινικής και Αυτοάνοσων Νοσημάτων για τις πολύτιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του στον σχεδιασμό της έρευνας.

Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Αναστάσιο Γερμενή, Διευθυντή του εν λόγω Μεταπτυχιακού Προγράμματος, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο πρόγραμμα και να εργαστώ πάνω στο ερευνητικό αυτό θέμα.

Οφείλω μεγάλη ευγνωμοσύνη στον κ. Μαυρόπουλο Αθανάσιο, μέλος του Εργαστηρίου Ανοσολογίας της Ρευματολογικής κλινικής, που με μύησε στην Κυτταρομετρία Ροής αλλά και για όλη την βοήθειά και την ενθάρρυνσή του.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω καθέναν από τους ασθενείς που με εμπιστεύτηκαν, ως γιατρό και ερευνήτρια και δέχθηκαν με χαρά να συμμετάσχουν στην έρευνα, παρέχοντάς μου βιολογικό υλικό και πληροφορίες για το ιστορικό τους.

Τέλος, ευχαριστώ τον σύντροφό μου Βασίλη που είναι άξιος συνοδοιπόρος στον επιστημονικό και στον προσωπικό μου βίο, βοηθώντας και παροτρύνοντάς με να ακολουθώ πάντα τα όνειρά μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η Σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μια αυτοάνοση και σύνθετη πάθηση του κεντρικού νευρικού συστήματος, για την οποία δεν υπάρχει μέχρι στιγμής εξακριβωμένη αιτιοπαθογένεια και αποτελεσματική θεραπεία. Πρόσφατες μελέτες μιας κατηγορίας αντιβιοτικών, των τετρακυκλινών, υποδηλώνουν ότι μπορεί να έχουν θεραπευτικό αποτέλεσμα στην νόσο μέσα από την ανοσοτροποιοτική τους δράση. Η παρούσα μελέτη διεξήχθη με σκοπό την διερεύνηση της *in vitro* αποτελεσματικότητας δύο τετρακυκλινών, μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στους προφλεγμονώδεις και ρυθμιστικούς κυτταρικούς πληθυσμούς ασθενών με Σκλήρυνση κατά πλάκας.

Μέθοδοι: Στην μελέτη μας συμπεριελήφθησαν πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς χωρίς θεραπεία (Naïve, $n=5$), ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα μορφή της νόσου υπό διάφορες θεραπείες (RRMS, $n=10$), ασθενείς με δευτεροπαθής προϊούσα μορφή της νόσου (SPMS, $n=2$) καθώς και υγιείς δότες ($n=10$). Πραγματοποιήθηκε απομόνωση μονοπύρηνων λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, τα οποία διεγέρθηκαν χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά πρωτόκολλα ενεργοποίησης (μέσω της IL-12/IL-18 και μέσω PMA/Ιονομυκίνης) και επώαστηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης. Μέσα από κυτταρομετρία ροής μελετήθηκε η παραγωγή και η λειτουργικότητα προφλεγμονωδών και ρυθμιστικών κυτταρικών πληθυσμών, ώστε να διερευνηθεί και να συγκριθεί η δράση των δύο τετρακυκλινών.

Αποτελέσματα: Οι δύο τετρακυκλίνες παρουσίασαν μεγαλύτερη επίδραση έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική πτώση IFN- γ σε τρεις λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς (NKT, CD4+ T και CD8+ T λεμφοκύτταρα). Ο λεμφοκυτταρικός πληθυσμός, τον οποίο επηρέασαν περισσότερο ήταν τα NKTs. Αυτό διαπιστώθηκε σε όλες τις ομάδες ασθενών καθώς και σε υγιείς μάρτυρες. Η ομάδα ασθενών στην οποία φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη επίδραση τα δύο αντιβιοτικά ήταν οι naïve ασθενείς. Από τις δύο τετρακυκλίνες, η δοξυκυκλίνη ήταν αυτή που σημείωσε την ισχυρότερη δράση όσον αφορά την καταστολή της IFN- γ . Και οι δύο ωστόσο, δεν διαπιστώθηκε να έχουν κάποιο αποτέλεσμα όσον αφορά την δράση τους στην παραγωγή IL-17, ούτε να επηρεάζουν τους πληθυσμούς Tregs/Bregs.

Συμπεράσματα: Η μινοκυκλίνη και πολύ περισσότερο η δοξυκυκλίνη μπορούν να καταστείλουν την παραγωγή IFN- γ σε αρκετούς λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς και ιδιαίτερα στον NKT πληθυσμό, μόνες ή σε συνδυασμό με άλλη κοινή φαρμακευτική θεραπεία της νόσου. Στην παρούσα μελέτη φάνηκε να έχουν αποτέλεσμα στις περισσότερες μορφές της νόσου και κυρίως στους naïve ασθενείς. Στα πειράματα, η δράση τους φάνηκε να είναι δοσο-εξαρτώμενη και κυτταρο-εξαρτώμενη. Ιδιαίτερα η δοξυκυκλίνη, με το πλεονέκτημα των λιγότερων ανεπιθύμητων ενεργειών και του ισχυρότερου φάσματος δράσης στους προφλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς ασθενών αξίζει να ερευνηθεί μελλοντικά ως θεραπευτικός στόχος της νόσου.

ABSTRACT

Background: Multiple Sclerosis is an autoimmune and complex central nervous system disease for which there is no established pathogenesis and effective treatment so far. Recent studies of a class of antibiotics, tetracyclines, suggest they may have a therapeutic effect on the disease through their immunomodulatory action. The present study was conducted to investigate the in vitro efficacy of two tetracyclines, minocycline and doxycycline in the proinflammatory and regulatory cell populations of patients with multiple sclerosis.

Methods: In our study, newly diagnosed patients without treatment (naïve, n = 5), patients with relapsing-remitting multiple sclerosis under various therapies (RRMS, n = 10), patients with secondary progressive multiple sclerosis (SPMS, n = 2) and healthy donors (n = 10) were included. Peripheral blood mononuclear lymphocytes were isolated, which were stimulated using two different activation protocols (via IL-12 / IL / 18 and via PMA / Ionomycin) and incubated in the presence of different concentrations of minocycline and doxycycline. Through flow cytometry, the production and functionality of proinflammatory and regulatory cell populations were investigated and compared the action of the two tetracyclines.

Results: The two tetracyclines showed a greater effect following stimulation with IL-12 and IL-18, where a statistically significant decrease in IFN- γ was observed in three lymphocyte populations (NKT, CD4 + T and CD8 + T lymphocytes). The lymphocyte population, which most affected them, were NKTs. This was found in all patient groups as well as in healthy controls. The group of patients in whom the two antibiotics seemed to have a greater effect was the naive patients. Of the two tetracyclines, doxycycline was the one with the strongest effect on IFN- γ suppression. Both, however, were found not to have any effect on their activity in IL-17 production nor to affect the Tregs / Bregs populations.

Conclusion: Minocycline and much more doxycycline can suppress the production of IFN- γ in several lymphocyte populations, particularly in NKT population, alone or in combination with other common pharmaceutical treatment of disease. In the present study, it appeared to have an effect on most forms of the disease and especially on naïve patients. In experiments, their activity appeared to be dose-dependent and cell-dependent. Particularly doxycycline, with the advantage of fewer side effects and stronger action spectrum in proinflammatory cell populations deserve to be investigated as a future therapeutic target disease.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ	ΑΓΓΛΙΚΕΣ
<p>ΣκΠ: Σκλήρυνση κατά Πλάκας</p> <p>ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα</p> <p>Η.Π.Α: Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής</p> <p>ΠΝΣ: Περιφερικό Νευρικό σύστημα</p> <p>ΝΟ: Νιτρικό Οξείδιο</p> <p>ΕΝΥ: Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό</p> <p>ΑΕΦ: Αιματο-Εγκεφαλικός Φραγμός</p> <p>ΕΔ: Ενδοπλασματικό Δίκτυο</p>	<p>MS: Multiple Sclerosis</p> <p>RRMS: Relapsing Remitting Multiple Sclerosis</p> <p>SPMS: Secondary Progressive Multiple Sclerosis</p> <p>PPMS: Primary Progressive Multiple Sclerosis</p> <p>FDA: Food and Drug Administration</p> <p>NK: Natural Killers</p> <p>MBP: Myelin Basic Protein</p> <p>MAG: Myelin Associated Glycoprotein</p> <p>MOG: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</p> <p>MHC: Major Histocompatibility Complex</p> <p>HLA: Human Leukocyte Antigen</p> <p>EBV: Epstein Barr Virus</p> <p>HHV: Human Herpes Virus</p> <p>IFN: Interferon</p> <p>TNF: Tumor Necrosis Factor</p> <p>MAGNIMS: Magnetic Resonance Imaging in MS</p> <p>MRI: Magnetic Resonance Imaging</p> <p>APC: Antigen Presenting Cell</p> <p>STAT: Signal Transducer Activator of Transcription</p> <p>NKT: Natural Killer T Cells</p> <p>KIR: Killer cell immunoglobulin like Receptors</p> <p>CTLA: Cytotoxic T-lymphocyte Associated Antigen</p> <p>TCs: Tetracyclines</p> <p>MMPs: Matrix Metalloproteinases</p> <p>ROS: Reactive Oxygen Species</p> <p>PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells</p> <p>LPS: Lipopolysaccharides</p> <p>FCS: Fetal Bovine Serum</p> <p>DMSO: Dimethyl Sulfoxide</p> <p>PAMPs: Pathogen Associated Molecular Pattern</p> <p>EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis</p>

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ) ή Πολλαπλή Σκλήρυνση (Multiple Sclerosis, MS) είναι μια χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) που προσβάλλει τους μυελικούς άξονες, καταστρέφοντας την μυελίνη και τους νευράξονες σε ποικίλους βαθμούς (1). Αυτό που χαρακτηρίζει την ΣκΠ είναι η εμφάνιση πολλαπλών περιοχών φλεγμονής στον ΚΝΣ και πιο συγκεκριμένα στη μυελίνη, οι οποίες καλούνται απομυελινωτικές πλάκες (2). Η πορεία της ΣκΠ είναι εξαιρετικά ποικίλη και απρόβλεπτη. Στους περισσότερους ασθενείς όμως, η νόσος χαρακτηρίζεται αρχικά από επεισόδια αναστρέψιμων νευρολογικών ελλειμμάτων, τα οποία στη συνέχεια ακολουθούνται από προοδευτική νευρολογική επιδείνωση με την πάροδο του χρόνου (3). Με βάση την πορεία της νόσου, οι ασθενείς μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες, όπως φαίνεται παρακάτω και στον **Πίνακα 1.1**:

- 1 Η Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα μορφή της νόσου (Relapsing Remitting MS, RRMS):
Είναι η συνηθέστερη κλινική μορφή της νόσου και αντιπροσωπεύει το ~85% των περιπτώσεων κατά την έναρξη. Στη μορφή αυτή της νόσου οι υποτροπές ακολουθούνται από περιόδους υφέσεων. Ως υποτροπή ορίζεται η επιδείνωση ήδη υπαρχόντων συμπτωμάτων ή η παρουσία νέων διαρκείας 24 ωρών ή περισσότερο και εμφάνισης στη συνέχεια περιόδου βελτίωσης (4). Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν κυρίως κόπωση, οπτικές διαταραχές, έλλειψη ισορροπίας, προβλήματα ουροδόχου κύστης, μυϊκή αδυναμία και σπαστικότητα (5).
- 2 Η Δευτεροπαθής Προϊούσα μορφή της νόσου (Secondary Progressive MS, SPMS):
Συνήθως αναπτύσσεται σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα μορφή της νόσου, παρά τη θεραπεία με ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες (disease-modifying agents). Η μορφή αυτή της νόσου ορίζεται όταν μια περίοδος νευρολογικής επιδείνωσης έχει τεκμηριωθεί για τουλάχιστον 6 με 12 μήνες (6). Η πορεία της νόσου συνεχίζει να επιδεινώνεται με ή χωρίς περιόδους ύφεσης ή εξισορρόπησης.
- 3 Η Πρωτοπαθής Προϊούσα μορφή της νόσου (Primary Progressive MS, PPMS): Περίπου το 10-20% των ασθενών κατατάσσονται σε αυτήν την κατηγορία. Αυτή η μορφή εμφανίζεται κατά μέσο όρο στην ηλικία των 40 ετών (7) και η πορεία της νόσου είναι συνεχώς επιδεινούμενη. Σε αυτήν την μορφή της νόσου, οι υποτροπές συνήθως απουσιάζουν, αν και περιστασιακά εμφανίζονται περιόδοι ύφεσης ή σταθεροποίησης (πλατώ).

Μία μορφή της νόσου, η οποία συγχέεται πολλές φορές με την RRMS, είναι η Προοδευτική Διαλείπουσα μορφή της νόσου (Progressive Relapsing MS, PRMS), στην οποία οι ασθενείς έχουν συμπτώματα υποτροπών, αλλά τις περισσότερες φορές χωρίς πλήρη ανάκαμψη από αυτές (8).

Μεταξύ των υποτροπών, η ασθένεια συνεχώς επιδεινώνεται. Η μορφή αυτή της νόσου είναι και η πιο σπάνια, καθώς εμφανίζεται μόνο στο ~5% των ασθενών (9).

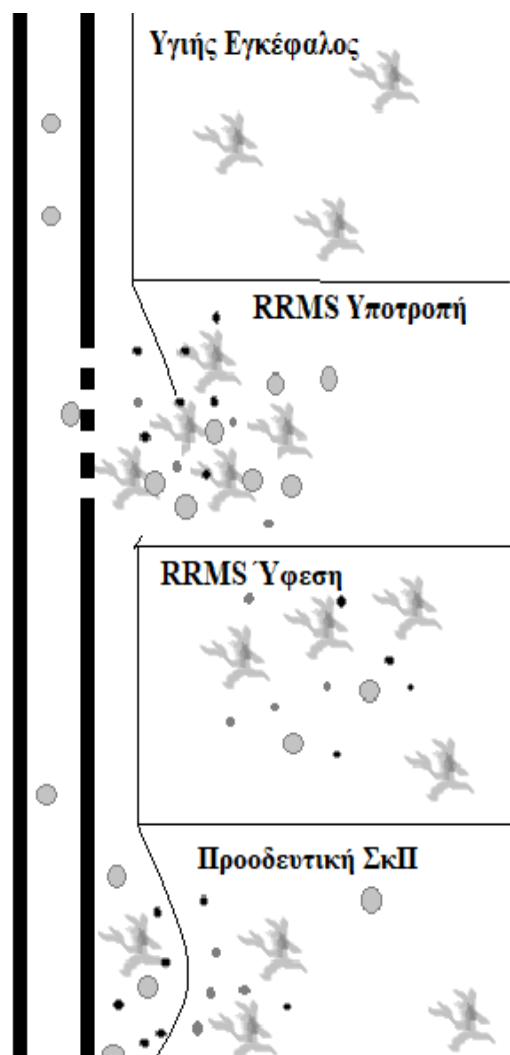
Η πρόοδος της νόσου δύναται τελικά να οδηγήσει τους ασθενείς σε σοβαρή αναπηρία. Ο μικρός βαθμός αναπηρίας και η καλή κλινική εικόνα ασθενών σε ικανοποιητικό εύρος χρόνου διακρίνουν την ΣκΠ στην καλοήγη μορφή της (καλοήγους Πολλαπλή Σκλήρυνση, Benign Multiple Sclerosis, Benign MS) (10). Το προσδόκιμο επιβίωσης, τις τελευταίες δεκαετίες, έχει αυξηθεί με το 1/3 των ασθενών να ζει περισσότερο από 30 έτη έπειτα από τη διάγνωση και η πλειονότητα τους να καταλήγει από αιτίες μη σχετιζόμενες με τη νόσο (11). Πολλοί φαρμακευτικοί παράγοντες έχουν χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσουν τα συμπτώματα της νόσου. Παρόλα αυτά οριστική και αποτελεσματική θεραπεία για την ΣκΠ δεν έχει ακόμα ανακαλυφθεί.

Καθώς ο αριθμός των εγκεκριμένων από τον οργανισμό FDA (Food and Drug Administration) συνεχίζει να αυξάνεται και οι έρευνες στο πεδίο της θεραπευτικής αντιμετώπισης της νόσου

επεκτείνονται, η επιστημονική κοινότητα είναι αισιόδοξη ότι η θεραπεία της ΣκΠ προσεγγίζεται ολοένα και περισσότερο. Το γεγονός ότι αυτή η νόσος πλήττει κυρίως τις παραγωγικές ηλικίες και εκδηλώνεται με σοβαρή κινητική δυσλειτουργία και έκπτωση του επιπέδου ποιότητας ζωής αποτελεί ένδειξη άμεσης διερεύνησης νέων θεραπευτικών μέσων.

Πίνακας 1.1. Τύποι της ΣκΠ, όπως εκδηλώνεται κλινικά

Μορφή της νόσου	Ειδικά χαρακτηριστικά
<u>Υποτροπιάζουσα-Διαλείπουσα μορφή της νόσου (Relapsing–Remitting MS, RRMS)</u>	Η πιο κοινή μορφή, αντιπροσωπεύει το ~85% των περιπτώσεων. Χαρακτηρίζεται από νευρολογική επιβάρυνση, ακολουθούμενη από περιόδους ανάκαμψης. Μεταξύ των υποτροπών,



Εικόνα 1.2 : Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την φλεγμονή του ΚΝΣ, μέσω διαπερατότητας του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού σε διάφορους φαινότυπους της νόσου.

	ο ασθενής δεν εμφανίζει επιδείνωση της κλινικής εικόνας.
<u>Δευτεροπαθής Προϊούσα μορφή της νόσου</u> (Secondary Progressive MS, SPMS)	Χαρακτηρίζεται από αρχικές υποτροπές, ακολουθούμενη από σταδιακή νευρολογική επιβάρυνση που δεν σχετίζεται με οξείες επιθέσεις
<u>Πρωτοπαθής Προϊούσα μορφή της νόσου</u> (Primary Progressive MS, PPMS)	Στην μορφή αυτή της νόσου, δεν υπάρχουν υποτροπές και οι ασθενείς εμφανίζουν σταθερή επιδείνωση από την έναρξή της.

2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η ποικιλομορφία της νόσου, αλλά και η υποκειμενικότητα των φαινοτύπων της, δυσχεραίνουν τις επιδημιολογικές μελέτες της, οι οποίες δείχνουν μια ιδιαίτερη γεωγραφική κατανομή. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα της πάθησης φαίνεται να αυξάνεται με την αύξηση του γεωγραφικού πλάτους, βόρεια και νότια, λαμβάνοντας τον χαρακτηρισμό νόσο των εύκρατων βορείων κλιμάτων. Με κριτήριο τον αριθμό των περιστατικών που υπάρχουν ήδη στον πληθυσμό μια δεδομένη στιγμή (επιπολασμός), η ετήσια επίπτωση της νόσου στην Ευρώπη κατά μέσο όρο είναι 4,3 περιστατικά ανά 100.000 με μέσο επιπολασμό 83 άτομα ανά 100.000 κατοίκους (12). Μεγαλύτεροι αριθμοί, όπως αναφέρθηκε παρατηρούνται σε βορειότερες Ευρωπαϊκές χώρες και η νόσος προσβάλλει κυρίως νέους ενήλικες κατά την 3^η δεκαετία της ζωής τους, με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου να είναι τα 35-64 έτη (1, 3). Ο λόγος γυναίκες προς άνδρες ποικίλει σε διάφορες χώρες, αλλά κατά μέσο όρο είναι 2:1, φανερώνοντας μια την προτίμηση της νόσου στο γυναικείο φύλο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Η.Π.Α), ο επιπολασμός είναι 149.2 ανά 100.000 κατοίκους με ένα μέσο όρο γυναικών/ανδρών να είναι 3.13/1 και τις Ανατολικές Πολιτείες να αποτελούν περιοχή υψηλής επικινδυνότητας (13). Στην Ελλάδα, δεδομένα από το 1984 έως το 2006 φανερώνουν μια αύξηση του επιπολασμού και της επίπτωσης της νόσου μέσα σε 23 χρόνια, από 10.1/100.000 σε 119.61/100.000 και από 2.71/100.00 σε 10.73/100.000 (14).

Η γεωγραφική εμφάνιση της νόσου εγείρει ερωτήματα, ως προς τους παράγοντες που την προκαλούν και έχει κατά καιρούς αμφισβητηθεί (15). Ίσως οι περιβαλλοντικές μεταβολές να μπορούν να δικαιολογήσουν τις γεωγραφικές διακυμάνσεις εμφάνισης της νόσου. Για παράδειγμα κάποιες μελέτες έχουν αποκαλύψει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ κινδύνου εκδήλωσης ΣκΠ και ηλιοφάνειας (16, 17). Ακόμη μια Νορβηγική μελέτη έδειξε ότι οι υπαίθριες δραστηριότητες στην παιδική ηλικία, μείωσαν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ακόμα και στις περιοχές βόρεια του

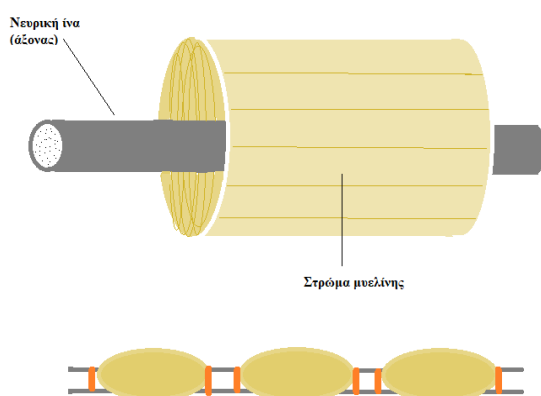
Αρκτικού Κύκλου (18). Η αύξηση του επιπολασμού, σε παγκόσμιο επίπεδο μπορεί να δικαιολογηθεί και από την αύξηση του προσδόκιμου ζωής (19).

Μελέτες σε πληθυσμούς μεταναστών δείχνουν ότι η μετακίνηση πληθυσμών σε χώρες διαφορετικής επικινδυνότητας για τη νόσο, σχετίζονται με αντίστοιχη αλλαγή κινδύνου μόνο σε ηλικίες των 10-20 ετών, υποδηλώνοντας ίσως την ύπαρξη κάποιου λοιμώδους παράγοντα κατά την παιδική ηλικία που προδιαθέτει για την νόσο (20). Το γεγονός ότι τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων της νόσου στο γυναικείο πληθυσμό (15) έχει προκαλέσει παγκόσμιο ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς τους παράγοντες που την προκαλούν, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.

3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η παθογένεια της νόσου εμπλέκει πολλούς μηχανισμούς, με τον μηχανισμό της αυτοανοσίας να διαδραματίζει τον σημαντικότερο και κυριότερο ρόλο στην έναρξη και την πορεία της νόσου (3), αν και έχει αναφερθεί και εμφάνιση της με μη ανοσο-μεσολαβούμενη καταστροφή κυττάρων του ΚΝΣ (21). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η χρόνια φλεγμονή αποτελεί το χαρακτηριστικό πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών με παραδείγματα εκτός της ΣκΠ, της νόσου του Alzheimer και της νόσου του Parkinson (22). Για την κατανόηση του μηχανισμού παθογένειας της ΣκΠ, θα γίνει μια σύντομη ανατομική περιγραφή του ελύτρου μυελίνης.

Το έλυτρο μυελίνης είναι μια εκτεταμένη και τροποποιημένη πλασματική μεμβράνη, που τυλίγεται γύρω από τον νευράξονα με σπειροειδή τρόπο (23). Τα συστατικά στοιχεία της μυελίνης προέρχονται και αποτελούν μέρος των κυττάρων Schwann στο Περιφερικό Νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) και των ολιγοδενροκυττάρων στο ΚΝΣ (24). Η παρουσία της μυελίνης (**Εικόνα 3.1**)



Εικόνα 3.1: Απεικονίζεται ένας υγιής άξονας, η μυελίνη γύρω από αυτόν και οι διάλυτοι ιόντων (πορτοκαλί) συγκεντρωμένοι στους μη μυελινωμένους κόμβους του Ranvier.

βελτιώνει την αποδοτικότητα της αγωγής δυναμικών ενέργειας από τους νευράξονες, αυξάνοντας την διάμετρό τους και παρέχοντάς τους μόνωση. Μια βλάβη σε αυτό το σημαντικό στοιχείο των νευρωνικών κυττάρων εμποδίζει την φυσιολογική αγωγή σήματος και αυτό διαφαίνεται και από την χαρακτηριστική καθυστέρηση προκλητών δυναμικών. Η καταστροφή του ελύτρου της στην ΣκΠ, έχει μελετηθεί αρκετά και θεωρείται ότι διαμεσολαβείται από την δράση ανοσοκυττάρων του ΚΝΣ, που εκκρίνουν προ-

φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, NO και μεταλλοπρωτεάσες μήτρας (25).

Σε αντίθεση με ότι υποστηριζόταν στο παρελθόν η βλάβη δεν περιορίζεται μόνο στην μυελίνη των νευραξόνων, αλλά από τα αρχικά στάδια της νόσου φαίνεται να υπάρχει αξονική εκφύλιση, η οποία σχετίζεται με υπολειπόμενη νευρολογική σημειολογία και εξέλιξη αναπηρίας (26). Η αξονική βλάβη στην ΣκΠ μπορεί να είναι ταυτόχρονη με την απομυελίνωση αλλά όχι απαραίτητα συνεπαγόμενη με την καταστροφή της μυελίνης (27). Πάντως η απομυελίνωση λόγω αντισωμάτων κατά των αντιγόνων μυελίνης στον άξονα, οδηγεί σε ανακατανομή των διαύλων ιόντων κατά μήκος του άξονα, παρεμποδίζοντας την αγωγιμότητά του. Παράλληλα, αντισώματα για μη-μυελικά αντιγόνα βλάπτουν επίσης τους νευράξονες και η νευραξονική μεταφορά είναι επίσης διαταραγμένη (28, 29).

Γενικά για την εκδήλωση της νόσου είναι απαραίτητα δύο βήματα: (i) βλάβη του ελύτρου μυελίνης με αποτέλεσμα βλάβες στο ΚΝΣ και (ii) φλεγμονή, τα οποία μαζί καταστρέφουν τους νευρωνικούς ιστούς. Ως σημαντικότερες διεργασίες που ξεχωρίζουν στην παθογένεση της νόσου είναι: η λεμφοκυτταρική διήθηση, η ενεργοποίηση της μικρογλοίας, η καταστροφή της μυελίνης, η αστρογλοιακή ουλή και η βλάβη των νευραξόνων (30). Η αστρογλοιακή ουλή σηματοδοτεί την χρονιότητα της νόσου και την λειτουργική καταστροφή. Στις βλάβες της λευκής ουσίας παρατηρείται διήθηση μονοκυττάρων, Τ κυττάρων, Β κυττάρων και δενδριτικών κυττάρων (31). Τα κύτταρα που συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου είναι τα CD4+ Th1 και Th2 βοηθητικά λεμφοκύτταρα, τα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα, τα CD4+CD25+ Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, τα Β λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα, τα μαστοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα (32). Τα Β λεμφοκύτταρα, και συγκεκριμένα τα πλασματοκύτταρα, παράγουν αντισώματα ειδικά έναντι της μυελίνης, τα οποία μέσω του καταρράκτη του συμπληρώματος συμμετέχουν στην δημιουργία συμπλεγμάτων μεμβρανικής επίθεσης, οδηγώντας σε νευρωνική καταστροφή (33). Από τα Τ λεμφοκύτταρα μολονότι CD4+ κύτταρα φαίνεται να πρωτοστατούν στην παθογένεση της ΣκΠ, ιδιαίτερα σημαντικός είναι και ο ρόλος των CD8+ κυττάρων, καθώς μεσολαβούν στην καταστολή και την αδρανοποίηση των CD4+ κυττάρων (34) και επιπλέον προάγουν την καταστροφή ολιγοδενδροκυττάρων (34). Τα αυτοδραστικά Τ-κύτταρα που αντιδρούν με την μυελίνη των νευρικών κυττάρων διαπερνούν τον δυσλειτουργικό ΑΕΦ και μεταναστεύουν στο ΚΝΣ, όπου πυροδοτούν έναν καταρράκτη φλεγμονώδους αντίδρασης και καταστροφής των νευραξόνων, δημιουργώντας τις χαρακτηριστικές πλάκες ή εστίες της νόσου (35). Τα κύτταρα αυτά έχουν αποδειχθεί ότι αναγνωρίζουν πρωτεΐνες της θήκης μυελίνης, συμπεριλαμβανομένης της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP), της γλυκοπρωτεΐνης που σχετίζεται με μυελίνη (MAG) και της γλυκοπρωτεΐνης ολιγοδενδροκυττάρων μυελίνης (MOG) (36). Μέσω αποφυγής απόπτωσης κυρίως λόγω λόγω υπερέκφρασης β-αρρεστίνης 1, τα αυτοδραστικά αυτά λεμφοκύτταρα εγκαθιδρύουν μια συνεχή ανοσοαπόκριση στο ΚΝΣ με αποτέλεσμα τις βλάβες της νόσου (37). Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, οι ανοσολογικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην

παθογένεια της νόσου είναι ποικίλοι και ακόμα δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη οι μεταξύ τους σχέση.

Τα κύρια χαρακτηριστικά μιας απομυελινωτικής πλάκας είναι η απώλεια μυελίνης, η σχετική διατήρηση των αξόνων και ο σχηματισμός αστροκυτταρικής ουλής (38). Οι βλάβες διαχέονται σε ολόκληρο το ΚΝΣ, με ιδιαίτερη προτίμηση για τα οπτικά νεύρα, τον νωτιαίο μυελό, το εγκεφαλικό στέλεχος, την παρεγκεφαλίδα και τις περιφερικές περιοχές της λευκής ουσίας (39). Παρόλο που η ΣκΠ έχει θεωρηθεί νόσος που προσβάλλει την λευκή ουσία του ΚΝΣ, απεικονιστικά ευρήματα δείχνουν ότι προκαλεί βλάβες και στην γκρίζα ουσία του ΚΝΣ (40). Στον μηχανισμό της φλεγμονής συμμετέχουν μόρια προσκόλλησης, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, πρωτεάσες και προκαλούν ιστική βλάβη, αρχικά των ολιγοδενροκυττάρων και έπειτα των νευρωνικών αξόνων. Μη ανοσομεσολαβούμενη νευροεκφύλιση όπως εναπόθεση σιδήρου, υποξία, τοξικότητα μεσολαβούμενη από γλουταμινικό οξύ, οξειδωτικό στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συμμετέχει επίσης στην φλεγμονή του ΚΝΣ (30). Στα αρχικά στάδια, υπάρχει κάποιος βαθμός επιδιόρθωσης των βλαβών κυρίως μέσω της επαμυελίνωσης, αλλά στη συνέχεια οι μηχανισμοί αυτοί επιδιόρθωσης εξασθενούν και εκδηλώνονται τελικά σε μεγαλύτερο βαθμό τα κλινικά συμπτώματα της νόσου. Υπεύθυνος για την αναπηρία που παρατηρείται στις υποτροπές της νόσου είναι ο οξύς νευραξονικός τραυματισμός που συμβαίνει κατά την φλεγμονώδη φάση της νόσου (41).

Όσον αφορά τις πλάκες ή εστίες της ΣκΠ, έχουν προταθεί διάφορες κατατάξεις με βάση τα παθολογοανατομικά τους χαρακτηριστικά (42, 43), όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.2**.

Πίνακας 3.2. Παθολογοανατομική κατάταξη απομυελινωτικών πλακών στην ΣκΠ.

Οξεία: Υπερκυτταρικότητα, φαγοκυτταρική δραστηριότητα μακροφάγων έναντι μυελίνης, διάχυτη έκφραση των MHC τάξης II (Major Histocompatibility Complex) μορίων από μικρογλοία

Χρόνια Ενεργή: Ενεργή απομυελίνωση, φαγοκυτταρική δραστηριότητα μακροφάγων έναντι μυελίνης, έκφραση των MHC τάξης II (Major Histocompatibility Complex) μορίων από μικρογλοία και μακροφάγα μόνο στην περιφέρεια

Χρόνια Ανενεργή: Αστρογλοιακή ουλή, απομυελίνωση, απουσία φλεγμονωδών κυττάρων και έκφρασης MHC II μορίων

Με βάση την απώλεια μυελίνης, την έκταση της απομυελινωτικής πλάκας, την τοπογραφία, την καταστροφή των ολιγοδενδοκυττάρων, την παρουσία ή όχι επαναμυελίνωσης, την εναπόθεση ανοσοσφαιρίνης και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, οι οξείες ενεργές βλάβες της λευκής ουσίας στους ασθενείς εμφανίζουν μια ετερογένεια που οδήγησε τους Lucchinetti et. al. να ταξινομήσουν αυτές τις βλάβες σε τέσσερις υπότυπους (44).:

1. Οι τύπου I απομυελινωτικές εστίες: Εμφανίζονται στο 15% των ασθενών με ΣκΠ που υποβάλλονται σε βιοψία. Χαρακτηρίζονται από ενεργή απομυελίνωση με ίση απώλεια όλων των συστατικών μυελίνης, έλλειψη εναπόθεσης ανοσοσφαιρίνης και έλλειψη ενεργοποίησης συμπληρώματος σε T λεμφοκύτταρα. Παρουσιάζουν σαφή όρια και περιφλεβική φλεγμονή.
2. Οι τύπου II απομυελινωτικές εστίες: Εμφανίζονται στο 58% των ασθενών με ΣκΠ που υποβάλλονται σε βιοψία. Συμμετέχουν οι ίδιοι μεσολαβητές φλεγμονής όπως στις τύπου I βλάβες με παράλληλη ενεργοποίηση όμως αντισωμάτων ενεργοποιημένων από συμπλήρωμα. Και σε αυτήν την περίπτωση οι εστίες παρουσιάζουν σαφή όρια και περιφλεβική φλεγμονή.
3. Οι τύπου III απομυελινωτικές εστίες: Εμφανίζονται στο 26% των ασθενών με ΣκΠ που υποβάλλονται σε βιοψία. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε αυτές τις βλάβες και η απώλεια/απόπτωση ολιγοδενδοκυττάρων είναι έκδηλη. Δεν έχει αναφερθεί καμία απόδειξη εναπόθεσης ανοσοσφαιρίνης και ενεργοποίησης συμπληρώματος αλλά είναι βέβαιη η εκλεκτική απώλεια πρωτεΐνης MAG και η ανάστροφη ολιγοδενδροπάθεια. Παρουσιάζουν ασαφή όρια και όχι περιφλεβική φλεγμονή.
4. Οι τύπου IV απομυελινωτικές εστίες: Εμφανίζονται μόνο στο 1% των ασθενών που υποβάλλονται σε βιοψία και χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη μη αποπτωτική απώλεια ολιγοδενδροκυττάρων και αξονική βλάβη. Τα όριά τους είναι σαφή και παρουσιάζουν ή όχι περιφλεβική φλεγμονή.

4 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Τα αίτια της νόσου παραμένουν ασαφή μέχρι σήμερα, ωστόσο πολλές μελέτες καταλήγουν ότι στην παθογένεση της νόσου, εμπλέκονται περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως ιϊκές λοιμώξεις σε συνδυασμό με γενετικούς προδιαθεσικούς παράγοντες (2). Σε μια πρόσφατη μετά-ανάλυση σε διδύμους φάνηκε ότι η γενετική κληρονομικότητα συμβάλλει συνολικά κατά 40-50%, το περιβάλλον κατά 29% και η γενετική και το περιβάλλον μαζί κατά 10-30% (45).

Γενετικοί παράγοντες

Η συσχέτιση της ΣκΠ και του ανθρώπινου αντιγόνου λευκοκυττάρων (HLA) περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1970 (46). Ο γενετικός αυτός τύπος κωδικοποιεί τα γονίδια που παρουσιάζουν

πεπτιδία αντιγόνα στα Τ λεμφοκύτταρα και οι πολυμορφισμοί του έχουν μελετηθεί ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης Σεπ. Γενικά σε πολυπαραγοντικά νοσήματα όπως η ΣκΠ δεν έχουν τόσο σημασία οι μεταλλάξεις αλλά οι συχνοί γενετικοί πολυμορφισμοί (47). Συσχετίσεις μεταξύ του απλοτύπου HLA-DR15 και της ΣκΠ έχουν περιγραφεί σε ευρωπαϊκούς και μη ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (48). Συγκεκριμένα οι περισσότερες μελέτες του HLA επικεντρώθηκαν στην τάξη II του MHC που διαιρείται σε τρεις κύριες υποπεριοχές DP, DQ και DR. Οι DR2, DR(1*1501), DQ(1*602), DQA102 και ο DW2 απλότυποι βρίσκονται συχνά σε ασθενείς με ΣκΠ. Ο πληθυσμός της Σαρδηνίας είναι μια αξιοσημείωτη εξαίρεση, που έχει σχέση με το DR4 και όχι με HLA-DR15 (49). Έχει υπολογιστεί ότι υπάρχουν δυνητικά 350 υποψήφια γονίδια ευαισθησίας για ευαισθησία στη νόσο εκτός του MHC (50), μεταξύ των οποίων και τα γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της βιταμίνης D. Οι πιο πρόσφατες μελέτες συσχέτισης διαπιστώνουν ότι υπάρχουν πλέον πάνω από 50 γενετικοί τόποι που έχουν επιβεβαιωμένη συσχέτιση, ενώ πολλοί άλλοι υποψήφιοι τόποι εντοπίζονται σε χαμηλότερες πιθανότητες που περιμένουν επιβεβαίωση με μελέτες μεγάλης κλίμακας (51). Μελέτες που επικεντρώνονται σε οικογένειες ασθενών δείχνουν ότι ο επιπολασμός της ΣκΠ σε συγγενείς α' βαθμού είναι 20 με 40 φορές υψηλότερος συγκριτικά με τον υπόλοιπο πληθυσμό (51). Έρευνες σε ετεροθαλή αδέρφια τα οποία είχαν ανατραφεί σε ίδιες ή διαφορετικές οικογένειες δείχνουν ότι η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου οφείλεται κυρίως στο κοινό γενετικό ιστορικό παρά στο κοινό περιβάλλον (52). Επίσης μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα έδειξαν ποσοστό συνύπαρξης της νόσου της τάξης των 35% σε αντίθεση με διζυγωτικά δίδυμα που το ποσοστό ήταν ~2-5% (52). Στον Καναδά ο κίνδυνος εμφάνισης της ΣκΠ κατά τη διάρκεια ζωής ενός ανθρώπου είναι 0,002 για τον γενικό πληθυσμό και 0,25 για μονοζυγωτικούς διδύμους (53). Αυτή η έλλειψη πλήρους συσχέτισης μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων υποδεικνύει ότι εκτός από γενετικούς παράγοντες εμπλέκονται και περιβαλλοντικοί. Είναι σημαντικό όμως ότι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε αδέρφια, ετεροθαλή (half-sibling study) και μή και υιοθετημένα παιδιά έδειξαν ότι δεν υπήρχε κανένας παράγοντας οικογενειακού μικροπεριβάλλοντος που να προδιαθέτει σε ΣκΠ (54). Ο κίνδυνος για τα μέλη της οικογένειας φαίνεται να αυξάνεται με το γεωγραφικό πλάτος (55). Μια πρόσφατη μετά-ανάλυση έδειξε ότι σε μέλη οικογενείας για ΣκΠ έδειξε ότι άτομα μεγαλύτερης ηλικίας φαίνονται να επηρεάζονται από το γεωγραφικό πλάτος όσον αφορά τον κίνδυνο εμφάνισης ΣκΠ (56). Πλήθος γονιδιακών πολυμορφισμών που αφορούν γονίδια ιντερλευκινών (IL-2, IL-7) και κυτταροκινών (TNF-α) συμμετέχει επίσης στην εμφάνιση της νόσου (57).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Ενδείξεις ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες διαμορφώνουν συνθήκες νόσησης της ΣκΠ έχουν μελετηθεί εκτενώς. Πιθανολογείται ότι στα πρώτα χρόνια ζωής του ανθρώπου, ένας λοιμώδης παράγοντας, πιθανώς ιός, συνδέεται με την εμφάνιση της νόσου με παραδείγματα τα νησιά Orkney

και Shetlands, αλλά και τα νησιά Faroe (58, 59). Πολλές μολύνσεις από λοιμώδεις παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση της νόσου με πιο σημαντική την μόλυνση από τον ιό του Epstein-Barr (EBV). Η καθυστερημένη εκδήλωση μόλυνσης του EBV και η πρόκληση από αυτόν λοιμώδους μονοπυρήνωσης έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου (60). Συγκεκριμένες αλληλουχίες αντιγόνων του EBV είναι ομόλογες με αντιγόνα του ΚΝΣ, υποδηλώνοντας ότι η αυτοανοσία της ΣκΠ πιθανά να οφείλεται σε μοριακό μιμητισμό (61). Άλλοι λοιμώδεις παράγοντες που έχουν προταθεί ότι συνδέονται με εκδήλωση της νόσου είναι ο ιός του Έρπητα 6 (HHV-6, Human Herpes Virus) που προκαλεί την ερυθρά (62) και το χλαμύδιο της πνευμονίας, (*Chlamydia Pneumoniae*) που προκαλεί λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (63). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη νόσηση από ΣκΠ μέσω αυτών των λοιμωδών παραγόντων είναι η λανθάνουσα λοίμωξη του ΚΝΣ και η συστηματική απελευθέρωση IFN-γ αντίστοιχα.

Το γεωγραφικό πλάτος φαίνεται επίσης να διαδραματίζει κάποιο ρόλο. Στην Νορβηγία ο επιπολασμός της ΣκΠ είναι υψηλότερος σε γεωργικές περιοχές σε σχέση με ναυτιλιακές περιοχές (64). Οι Goldenbeg et al. Πρότειναν ως εξήγηση του γεωγραφικού πλάτους την βιταμίνη D (65), που είναι γνωστό ότι εξαρτάται από την UVB ακτινοβολία. Η ένταση της UVB ακτινοβολίας που φτάνει στη γη εξαρτάται από την εποχή αλλά και από το γεωγραφικό πλάτος συνεπώς υπάρχει άμεση συσχέτιση ποσότητας UVB ακτινοβολίας και της περιοχής, υποδηλώνοντας ότι η βιταμίνη D μπορεί να είναι ένας από τους παράγοντες που διαμορφώνουν συνθήκες νόσησης από ΣκΠ, εξαρτώμενες από την περιοχή. Είναι αξιοσημείωτο ότι όσον αφορά τη βιταμίνη D, τα επίπεδά της στο αίμα είναι μειωμένα σε υποτροπές της νόσου (66). Ακόμα, σε μια έρευνα που συμπεριλάμβανε 12 ασθενείς με ΣκΠ, στους οποίους δόθηκαν συμπληρώματα βιταμίνης D, παρατηρήθηκε μείωση στην εμφάνιση νέων βλαβών στον νευρικό τους ιστό (67).

Επίσης το κάπνισμα τσιγάρων θεωρείται ότι επηρεάζει την πρόοδο της ασθένειας, οδηγώντας σε ταχύτερη επιδείνωση κινητικής λειτουργίας (1). Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, το στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο για την έναρξη, όσο και για τις υποτροπές της νόσου (68).

5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η ΣκΠ προκαλεί συμπτώματα σχεδόν απ' όλα τα συστήματα, επηρεάζοντας κυρίως την κινητικότητα των ασθενών (69). Περισσότερο από το 30% των ασθενών με ΣΚ εμφανίζουν μέτρια έως σοβαρή σπαστικότητα, κυρίως στα κάτω άκρα. Τα αρχικά κλινικά ευρήματα σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας είναι συχνά αισθητικές διαταραχές, οι συνηθέστερες από τις οποίες είναι παραισθησίες (μούδιασμα και μυρμήγκιασμα), δυσαισθησίες (καψίματα και βελόνες), διπλωπία, αταξία, ίλιγγος και διαταραχές της ουροδόχου κύστεως (70). Χαρακτηριστικό είναι και το αίσθημα ηλεκτρικού ρεύματος κατά μήκος της σπονδυλικής κύστης ειδικά κατά την

κάμψη του αυχένα (σημείο Lhermitte) (71). Οι αισθητικές διαταραχές συνήθως υποχωρούν αλλά μερικές φορές εξελίσσονται σε χρόνιο νευροπαθητικό πόνο. Η νευραλγία του τριδύμου εμφανίζεται επίσης σε ασθενείς με ΣκΠ. Ένα άλλο κοινό σημάδι παρουσίας της ΣκΠ είναι η οπτική νευρίτιδα, που εκδηλώνεται με πλήρη ή μερική απώλεια της όρασης (72). Η δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης εμφανίζεται σε περισσότερο από το 90% των ασθενών με ΣκΠ και οδηγεί σε εβδομαδιαία ή συχνότερα επεισόδια ακράτειας στο ένα τρίτο των ασθενών. Τουλάχιστον στο 30% των ασθενών εμφανίζεται δυσκοιλιότητα (69). Η κόπωση εκδηλώνεται στο 90% των ασθενών και είναι η συνηθέστερη αναπηρία που σχετίζεται με την εργασία. Τα συμπτώματα συνήθως παρουσιάζουν εξέλιξη σε διάστημα ωρών και ημερών, φτάνουν στο μέγιστο στις 4 εβδομάδες και στη συνέχεια λύνονται αυτόματα χωρίς θεραπεία, με εξαίρεση τις προοδευτικές μορφές της νόσου, στις οποίες η ύφεση συχνά απουσιάζει (73).

Για την διάγνωση της ΣκΠ απαιτείται ένας συνδυασμός κλινικών, απεικονιστικών και εργαστηριακών ευρημάτων (74). Το ιστορικό και η κλινική εξέταση κρίνονται ιδιαίτερα σημαντικά για την εντόπιση της νόσου και των συστημάτων που πάσχουν. Η αυξανόμενη ενσωμάτωση παρακλινικών εκτιμήσεων, ειδικά απεικονιστικών, επιτρέπουν σήμερα ευκολότερα τη διάγνωση της νόσου (71). Η συνεχής αναδυόμενη τεχνολογία και η κλινική αλληλοεπικάλυψη της ΣκΠ με άλλες παθήσεις, απαιτούν συχνές αναθεωρήσεις των κριτηρίων που καθιστούν την ΣκΠ βέβαιη. Στο πλαίσιο αυτό το 2016 έγιναν αναθεωρήσεις των κριτηρίων MRI για τη διάγνωση της ΣκΠ από τους υπεύθυνους Ευρωπαϊκούς φορείς μαγνητική απεικόνισης στην ΣκΠ (MAGNIMS) (75) παράλληλα με τις αναθεωρήσεις των κριτηρίων του McDonald (76). Ένας κλινικός γιατρός που υποπεύεται την νόσο σε έναν ασθενή οφείλει να συλλέξει κλινικές, απεικονιστικές και εργαστηριακές πληροφορίες και στη συνέχεια, αφού αποκλείσει τις παθήσεις που μιμούνται την ΣκΠ, να εφαρμόσει τα διαγνωστικά κριτήρια McDonald. Στη συνέχεια αναφέρονται οι παρακλινικές, απεικονιστικές και εργαστηριακές εξετάσεις που θέτουν την διάγνωση της νόσου.

Μαγνητική Τομογραφία Εγκεφάλου (Magnetic resonance imaging -MRI)

Η MRI χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο στην διάγνωση της ΣκΠ, φανερώνοντας τις χαρακτηριστικές απομυελινωτικές περιοχές. Η Ευρωπαϊκή επιτροπή MAGNIMS (Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis) πρόσφατα πρότεινε τυποποιημένα πρωτόκολλα μαγνητικής τομογραφίας για τη διάγνωση, τον προσδιορισμό της πρόγνωσης και για την παρακολούθηση της πορείας ασθενών (77). Η MRI εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού παραμένει η πιο χρήσιμη από τις παρακλινικές εξετάσεις για τη διάγνωση της ΣκΠ και μπορεί να υποκαταστήσει τα κλινικά ευρήματα που προκύπτουν από την διάδοση της νόσου στον χώρο και στον χρόνο. Σύμφωνα με την επιτροπή αν και η MRI σπονδυλική στήλης δεν είναι υποχρεωτική σε όλες τις περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητα όταν υπάρχει υποψία εντόπισης της νόσου στον

νωτιαίο μυελό, όταν υπάρχει μια πρωταρχική προοδευτική πορεία, ή όταν η ΣκΠ παρουσιάζεται σε πληθυσμό στον οποίο η νόσος είναι λιγότερο συχνή (78).

	Αριθμός βλαβών με αντικειμενικά κλινικά στοιχεία	Πρόσθετα δεδομένα που απαιτούνται για τη διάγνωση ΣκΠ
≥ 2 κλινικές προσβολές	≥ 2	Κανένα
≥ 2 κλινικές προσβολές	1 (καθώς και σαφείς ιστορικές ενδείξεις προηγούμενης προσβολής που εμπλέκει μία βλάβη σε ξεχωριστή ανατομική θέση)	Κανένα
≥ 2 κλινικές προσβολές	1	Διασπορά στο χώρο που εκδηλώνεται από μία επιπλέον κλινική προσβολή που εμπλέκει ένα διαφορετικό μέρος του ΚΝΣ ή μέσω MRI
1 κλινική προσβολή	≥ 2	Διασπορά στο χρόνο που εκδηλώνεται από μία επιπλέον κλινική προσβολή ή μέσω MRI ή μέσω ενδείξεων στο ENY ολιγοκλωνικών ζωνών
1 κλινική προσβολή	1	Διασπορά στο χώρο που εκδηλώνεται από μία επιπλέον κλινική προσβολή που εμπλέκει ένα διαφορετικό μέρος του ΚΝΣ ή μέσω MRI ΚΑΙ Διασπορά στο χρόνο που εκδηλώνεται από μία επιπλέον κλινική προσβολή ή μέσω MRI ή μέσω ενδείξεων στο ENY ολιγοκλωνικών ζωνών

Εάν πληρούνται τα κριτήρια του McDonald 2017 και δεν υπάρχει καλύτερη εξήγηση για την κλινική παρουσίαση, η διάγνωση είναι ΣκΠ. Εάν υπάρχει υποψία ΣκΠ λόγω ενός κλινικά απομονωμένου συνδρόμου, αλλά τα κριτήρια McDonald 2017 δεν πληρούνται πλήρως, η διάγνωση είναι πιθανή ΣκΠ. Αν προκύψει άλλη διάγνωση που εξηγεί καλύτερα την κλινική συμπτωματολογία, η διάγνωση δεν είναι ΣκΠ. Δεν απαιτούνται πρόσθετες εξετάσεις για να αποδειχθεί η διάδοση στο χώρο και στο χρόνο. Ωστόσο, ακόμα κι αν δεν είναι απαραίτητη η MRI, MRI εγκεφάλου πρέπει να λαμβάνεται σε όλους τους ασθενείς στους οποίους διερευνάται η διάγνωση της ΣκΠ. Επιπλέον, θα πρέπει να πραγματοποιείται MRI σπονδυλικής στήλης ή εξέταση ENY σε ασθενείς με ανεπαρκή κλινικά και απεικονιστικά στοιχεία που υποστηρίζουν ΣκΠ, εκτός από την παρουσίαση ενός κλινικά απομονωμένου συνδρόμου ή της νόσου με άτυπα χαρακτηριστικά. Εάν πραγματοποιούνται απεικονίσεις ή άλλες εξετάσεις και είναι αρνητικές, πρέπει να υπάρχει προσοχή στο να τεθεί η διάγνωση της ΣκΠ και πρέπει να εξεταστούν εναλλακτικές διαγνώσεις.

1. Η κλινική διάγνωση που βασίζεται σε αντικειμενικά κλινικά ευρήματα για δύο επιθέσεις είναι πιο ασφαλής. Ιστορικό για μια προηγούμενη επίθεση, ελλείψει τεκμηριωμένων αντικειμενικών νευρολογικών ευρημάτων, μπορεί να περιλαμβάνει κλινικά γεγονότα με συμπτώματα και εξέλιξη χαρακτηριστική για μια προηγούμενη φλεγμονώδη απομυελινωτική επίθεση (τουλάχιστον μία επίθεση) και πρέπει να υποστηρίζεται από αντικειμενικά ευρήματα. Ελλείψει κλινικών αντικειμενικών ενδείξεων, απαιτείται προσοχή.

2. Υπάρχουν συγκεκριμένα κριτήρια MRI για διάδοση στο χώρο και στο χρόνο.

3. Η παρουσία ειδικών ολιγοκλωνικών ζωνών στο ENY δεν αποδεικνύει τη διάδοση στο χρόνο καθ'εαυτή αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά για τη μέτρηση της διάδοσης στο χρόνο

Πίνακας 5.1: Τα κριτήρια του McDonald 2017 για τη διάγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης σε ασθενείς με προσβολή κατά την έναρξη. Ανατύπωση από: Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria Alan J Thompson et. al., Lancet Neurol. 2018, doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.

Εξέταση του Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού (ENY)

Ένας μεγάλος αριθμός υποψήφιων βιοδεικτών του ENY για ΣκΠ έχει προκύψει τα τελευταία χρόνια. Η ανάπτυξη ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού πρωτεϊνών του ENY επέτρεψε την κατάδειξη διαφορετικών IgG κλάσματος στο ENY ασθενών με ΣκΠ. Αυτά τα κλάσματα παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά το 1959 και ονομάστηκαν ολιγοκλωνικές ζώνες. Το πιο χαρακτηριστικό πρότυπο που βρέθηκε στην ΣκΠ δείχνει τουλάχιστον δύο ζώνες στο ENY και κανένα σε δείγματα ορού (79). Η ευαισθησία για την ανίχνευση ολιγοκλωνικών ζωνών σε ασθενείς με MS με μέθοδο ισοηλεκτρικής εστίασης είναι περίπου 95% και η ειδικότητα είναι μεγαλύτερη από 86%. Επίσης η εξέταση του ENY αναδεικνύει συχνά ήπια πλειοκυττάρωση λεμφοκυτταρικού τύπου (<25 κύτταρα/cm³) και υψηλή πρωτεΐνη (συνήθως <1 g/L) (71).

Ηλεκτροφυσιολογικές εξετάσεις

Πολύ σημαντικό ρόλο επίσης στην διάγνωση της νόσου διαδραματίζουν οι ηλεκτροφυσιολογικές εξετάσεις και κυρίως τα οπτικά και ακουστικά προκλητά δυναμικά. Οι νευρο-ηλεκτρικές αποκρίσεις σε αισθητήρια ερεθίσματα μπορούν να καταγραφούν εύκολα και να ποσοτικοποιηθούν, παρέχοντας ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο στην ΣκΠ. Τα προκληθέντα δυναμικά είναι πολύ ευαίσθητα στο να αποκαλύπτουν «σιωπηλές βλάβες» ειδικά στην αρχή της ΣκΠ ή και όταν δεν υπάρχουν εμφανή νευρολογικά συμπτώματα (71). Η ανεύρεση παρατεταμένων χρόνων των προκλητών δυναμικών (οπτικών, ακουστικών και σωματοαισθητικών) ανευρίσκεται συχνά σε ασθενείς με ΣκΠ (80).

6 ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Οι στόχοι θεραπείας με ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες αποσκοπούν στη μείωση διάρκειας των υποτροπών, στη διατήρηση ικανοποιητικής ποιότητας ζωής και την παροχή συμπτωματικής ανακούφισης. Είναι κοινή πρακτική η θεραπεία των υποτροπών με ένα ενδοφλέβιο κορτικοστεροειδές όπως μεθυλπρεδνιζολόνη ή δεξαμεθαζόνη συνήθως διάρκειας 3-5 ημερών. Παρακάτω αναλύονται οι ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται σήμερα στη νόσο, προκειμένου να αναχαιτίσουν την πορεία της και να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών.

IFN-β

Η ιντερφερόνη-β (IFN-β) μαζί με την οξική γλατιραμέρη είναι από τις πρώτες θεραπευτικές αγωγές που χρησιμοποιήθηκαν στην ΣκΠ (81). Οι ιντερφερόνες γενικά αναστέλλουν τον ιικό αναδιπλασιασμό μέσω ποικίλων ανοσορρυθμιστικών μηχανισμών (82). Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ιντερφερόνες-β1α και β1 επηρεάζουν την πορεία της ΣκΠ, δεν είναι γνωστοί, οι ανοσορρυθμιστικές και αντιφλεγμονώδεις τους ιδιότητες θεωρούνται ωφέλιμες. Η IFN-β καταστέλλει την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των APCs και εμποδίζει τα Τ κύτταρα να διασχίσουν τον ΑΕΦ, ενώ διοχετεύει αυτο-δραστικά Τ κύτταρα στους λεμφοειδείς ιστούς (82).

Επίσης η θεραπεία με ιντερφερόνη έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό Th1 και αυξάνει την έκφραση της IL-10 κυτταροκίνης (83). Ωστόσο, η θεραπεία με ιντερφερόνες έχει αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες, μερικές από τις οποίες είναι: η ηπατική δυσλειτουργία, η λευκοπενία, διαταραχές του θυροειδούς, συμπτώματα τύπου γρίπης, επιδείνωση της σπαστικότητας και περιφερική νευροπάθεια (84).

Οξική Γλατιμέρη

Η Οξική γλατιμέρη [Glatiramer acetate (GA) (επίσης γνωστό ως Cop-1 και Copaxone)] είναι ένας από τους πρώτους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν για την θεραπευτική διαχείριση RRMS ασθενών. Αυτός ο παράγοντας φαίνεται να αλλάζει τον T λεμφοκυτταρικό φαινότυπο από Th1 σε Th2 (85) και επίσης επιδρά θετικά στην λειτουργία των Tregs (86). Πιστεύεται ότι η οξική γλατιμέρη δεσμεύοντας μόρια τάξης II MHC ανταγωνίζεται αντιγόνα συσχετιζόμενα με μυελική και νευραξονική καταστροφή, δρώντας προστατευτικά (87). Κλινικές μελέτες φάσης 3 έδειξαν ότι η θεραπεία ασθενών με τον παράγοντα αυτόν συσχετίστηκε με μείωση του ποσοστού υποτροπής κατά το ένα τρίτο, ενώ σημαντικός αριθμός ασθενών παρέμεινε χωρίς υποτροπές (88). Άλλες μελέτες που εστιάστηκαν στα απεικονιστικά ευρήματα της νόσου, έδειξαν ότι η αγωγή με οξική γλατιμέρη μείωσε τις νέες βλάβες συγκριτικά με άλλες θεραπευτικές μεθόδους (89). Ανεπιθύμητες ενέργειες όπως εξάψεις, άγχος, δύσπνοια, αίσθημα παλμών, θωρακικό πόνο έχουν αναφερθεί.

Φινγκολιμόδη

Η Φινγκολιμόδη είναι ένας ανοσοτροποποιητικός παράγοντας που εγκρίθηκε για την θεραπεία της ΣκΠ το 2010 στη Βόρειο Αμερική και έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την διαχείριση ασθενών με RRMS. Επηρεάζει τους υποδοχείς σφινγκοσίνης-1-φωσφορικού (sphingosine-1-phosphate, S1P) που εκφράζονται στους λεμφοειδείς και νευρικούς ιστούς (90). Επιπλέον, η θεραπεία με φινγκολιμόδη επιδρά θετικά τόσο στον αριθμό όσο και στη λειτουργία των Bregs, που υποδεικνύεται από την ενίσχυση της παραγωγής της IL-10 (91). Πρόσφατα ευρήματα σε RRMS ασθενείς δηλώνουν την ενίσχυση των CD19+ BTLA+ IL-10+ B λεμφοκυττάρων από την φινγκολιμόδη, το οποίο πιθανώς να σχετίζεται με την βελτίωση των συμπτωμάτων (92). Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την αποτελεσματικότητα της φινγκολιμόδης σε σχέση με άλλους παράγοντες, όπως οι ιντερφερόνες στην διπλή τυφλή κλινική δοκιμή TRANSFORMS, όπου φάνηκε ότι ο ετήσιος ρυθμός υποτροπής ήταν σημαντικά χαμηλότερος συγκριτικά με την IFN-β1α (93). Ένα σημαντικό ζήτημα που συνδέεται με την χρήση του παράγοντα αυτού είναι η ανάπτυξη της λοίμωξης από τον έρπητα ζωστήρα και οι σχετιζόμενες με αυτό νευρολογικές επιπλοκές. Πιο συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια κλινικής δοκιμής για την χρήση της φινγκολιμόδης σε ΣκΠ, σε υψηλότερες δόσεις του φαρμάκου, εμφανίστηκαν θανατηφόρες επιπλοκές (93). Γι'

αυτό και οι ασθενείς που δεν έχουν ανοσοποιηθεί έναντι του ιού του έρπητα ζωστήρα θα πρέπει να εμβολιάζονται πριν την έναρξη της θεραπείας.

Φουμαρικό διμεθύλιο

Το φουμαρικό διμεθύλιο, ένα εστερικό παράγωγο του φουμαρικού οξέος έχει ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες και αποτελεί μια εγκεκριμένη από του στόματος θεραπεία για την ΣκΠ. Έχει αποδειχθεί ότι δρα προστατευτικά στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (94) και ότι προκαλεί εξάντληση των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων (95). Δύο δημοσιευμένα άρθρα ανέφεραν την αποτελεσματικότητα αυτού του παράγοντα στην ΣκΠ. Στην ελεγχόμενη κλινική δοκιμή φάσης 3 CONFIRM οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η θεραπεία ασθενών RRMS και οξικής γλατιραμέρης προκάλεσε σημαντική μείωση στον ετήσιο ρυθμό υποτροπής και βελτίωσε απεικονιστικά ευρήματα σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (96). Το δεύτερο άρθρο δημοσιεύθηκε από τους Gold et. al. και επιβεβαίωσε ότι η θεραπεία των υποτροπιάζοντων ασθενών με ΣκΠ με φουμαρικό διμεθύλιο (σε δύο δοσολογικά σχήματα), μείωσε σημαντικά τον αριθμό των υποτροπών, το ετήσιο ποσοστό υποτροπής, το ποσοστό επιδείνωσης της αναπηρίας και τον αριθμό των βλαβών MRI (96).

Τεριφλουνομίδη

Η τεριφλουνομίδη είναι ένας από του στόματος εγκεκριμένος ανοσοτροποποιητικός παράγοντας για την ΣκΠ, ο οποίος δεσμεύεται στην πρωτεΐνη μιτοχονδριακής μεμβράνης που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση πυριμιδίνης και την αναστέλλει αναστρέψιμα (97). Πιστεύεται ότι αυτή η καταστολή της σύνθεσης πυριμιδίνης σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπως T και B λεμφοκύτταρα, είναι υπεύθυνη για τα ανοσορρυθμιστικά αποτελέσματα της τεριφλουνομίδης (98). Σε μια πρόσφατη μελέτη της τεριφλουνομίδης στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση των CD39+ Tregs και μείωση στα APCs των πλακών του Peyer (99). Η μελέτη TEMSO αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα της τεριφλουνομίδης στην ΣκΠ και κατέληξε στον θετικό αντίκτυπο αυτής στη μείωση υποτροπών και στη βελτίωση των απεικονιστικών ευρημάτων (98).

Ναταλιζουμάμπη

Η ναταλιζουμάμπη (natalizumab/Tysabri) είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-ιντεγκρίνης, που χρησιμοποιείται στη θεραπεία ασθενών με RRMS (100). Αυτό το μονοκλωνικό αντίσωμα στοχεύει στην α4-αλυσίδα της α4β1 ιντεγκρίνης επίσης γνωστό ως πολύ όψιμο ενεργοποιούμενο αντιγόνο4 (very late activating antigen-4, VLA-4), το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων και προκαλεί σημαντική μείωση συσσώρευσης ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων εντός του ΚΝΣ (101). Ο παράγοντας αυτός επιδρά στις ρυθμιστικές λειτουργίες των B λεμφοκυττάρων, αν και δεν απεδείχθη αποτελεσματικό στην κατασταλτική λειτουργία των Tregs (102). Αρκετές κλινικές δοκιμές φάσης 2 έχουν αξιολογήσει

την αποτελεσματικότητα της ναταλιζουμάμπης (100, 103), γεγονός που οδήγησε σε κλινικές δοκιμές φάσης 3. Οι κλινικές δοκιμές AFFIRM (104) και SENTINEL (105) έδειξαν μείωση του ποσοστού κλινικών υποτροπών μείωση του ρυθμού εξέλιξης της αναπηρίας καταδεικνύοντας τον θεραπευτικό ρόλο της ναταλιζουμάμπης στη ΣκΠ.

Αλεμτουζουμάμπη

Η αλεμτουζουμάμπη, (alemtuzumab επίσης γνωστό και ως Campath-1H) είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει το μόριο κυτταρικής επιφάνειας CD52-a που εκφράζεται στην επιφάνεια των ώριμων λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων και είναι εγκεκριμένο για τη θεραπεία χρόνιας Β λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (90). Το μονοκλωνικό αυτό αντίσωμα δρά αυξάνοντας τις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (όπως η IL-10 και ο TGF-β) ενώ μειώνει τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (όπως η IFN-γ, η IL-17, η IL-6 και ο TNF-α) ταυτόχρονα αυξάνει το ποσοστό των Tregs καθώς και τη λειτουργία τους (106). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η αλεμτουζουμάμπη επάγει την παραγωγή νευροτροφικών παραγόντων από τα ανασυσταθέντα αυτοαντιδραστικά Τ λεμφοκύτταρα (107). Στην κλινική δοκιμή CAMMS223 με συμμετέχοντες ασθενείς με RRMS μετά την θεραπεία με αλεμτουζουμάμπη η IFN-β1α βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στον ορό των ασθενών (108). Μετά από κλινικές δοκιμές φάσης 3 (109), η αλεμτουζουμάμπη έχει εγκριθεί ως θεραπευτικό μέσο για RRMS ασθενείς σε περισσότερες από 30 χώρες.

Μιτοξανδρόνη

Η Μιτοξανδρόνη (Mitoxantrone) χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τη θεραπεία συγκεκριμένων τύπων καρκίνων όπως για το non-Hodgkin's λέμφωμα, οξεία μυελική λευχαιμία και για κάποιους καρκίνους μαστού και προστάτη. Η μιτοξανδρόνη είναι ένας αναστολέας τοποϊσομεράσης τύπου II, ο οποίος διαταράσσει τη σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA των καρκινικών κυττάρων, ωστόσο επηρεάζονται επίσης και τα φυσιολογικά κύτταρα. Είναι ένα ισχυρό ανοσοκατασταλτικό που καταστέλλει Τ κύτταρα, Β κύτταρα και μακροφάγα και παράλληλα μειώνει τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IFN-γ, TNF-α και IL-2) (110). Σε ασθενείς με SPMS, η ενδοφλέβια ένεση 12 mg μιτοξανδρόνης κάθε 3 μήνες έως 2 χρόνια είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της εξέλιξης της αναπηρίας κατά 84% (111). Αρκετές παρενέργειες σχετίζονται με τη μιτοξανδρόνη, οι οποίες κυμαίνονται από ναυτία, έμετο, απώλεια μαλλιών έως καρδιοτοξικότητα, λευχαιμία, υπογονιμότητα, λοίμωξη, λευκοπενία και θρομβοπενία (112). Ως αποτέλεσμα, η χρήση του φαρμακευτικού αυτού παράγοντα στην ΣκΠ, μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου.

Ορισμένα από τα φάρμακα είναι βιολογικές θεραπείες δηλαδή εγχυόμενα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία καταστρέφουν τα Τ ή τα Β λεμφοκύτταρα που δρουν παθογενετικά στην ΣκΠ (113). Η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ΣκΠ, αποτέλεσε ορόσημο μιας νέας εποχής για την θεραπεία της.

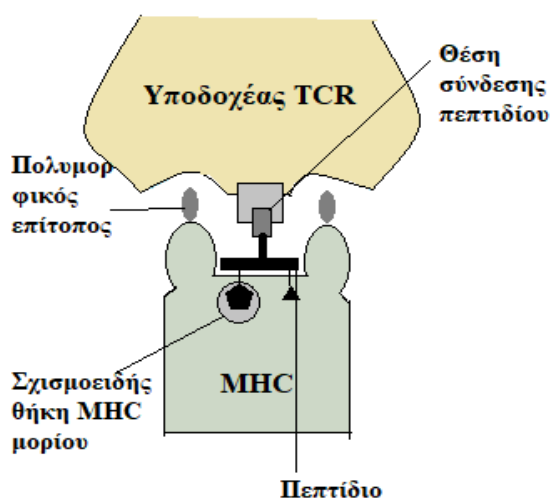
Αντι-CD20 mAbs

Αν και η ΣκΠ θεωρήθηκε παραδοσιακά νόσος μεσολαβούμενη από T λεμφοκύτταρα, η επιτυχία αρκετών κλινικών δοκιμών με καταστροφή B λεμφοκυττάρων μέσω αντι-CD20 μονοκλωνικών αντισωμάτων έχει καταδείξει τον ρόλο των B λεμφοκυττάρων στην παθογένεση της νόσου (114). Το CD20 είναι ένα επιφανειακό κυτταρικό αντιγόνο που εκφράζεται στα περισσότερα B λεμφοκύτταρα (115), ενώ δεν εκφράζεται στα λεμφοειδή βλαστοκύτταρα και στα περισσότερα πλασματοκύτταρα. Έχει αποδειχθεί ότι τα αντι-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα μειώνουν τους Th1 και Th17 κυτταρικούς πληθυσμούς στο πειραματικό μοντέλο αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, λόγω μειωμένης παρουσίας αντιγόνου από τα B λεμφοκύτταρα (116). Ένας άλλος μηχανισμός που έχει προταθεί προκειμένου να αιτιολογηθεί η αποτελεσματικότητα αντι-CD19 μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η σημαντική μείωση B κυττάρων που παράγουν IL-6. Τα αντι-CD0 αντισώματα οδηγούν σε σημαντική μείωση T και B λεμφοκυττάρων στο ENY ασθενών με RRMS (117). Γενικά η θεραπεία με αυτούς τους παράγοντες έδειξε ότι βελτιώνει τα συμπτώματα και την πορεία της νόσου ενώ παράλληλα βελτιώνει και τα απεικονιστικά ευρήματα, όσον αφορά τις βλάβες. Μέχρι στιγμής τέσσερα αντι-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα έχουν μελετηθεί στην ΣκΠ, η ριτουξιμάμπη (rituximab) που είναι ένα χμιαϊκό αντίσωμα IgG1 ποντικού/ανθρώπου, η οκρελιζουμάμπη (ocrelizumab) που είναι εξανθρωπισμένο αντίσωμα IgG1, η οφατουμουμάμπη (ofatumumab)-ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 και το εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα δακλιζουμάμπη (daclizumab).

Αντι-CD19 mAbs

Το CD19, μέλος της υπερ-οικογένειας Ig, που εκφράζεται σε όλα τα B λεμφοκύτταρα υποστηρίζεται ότι είναι ο κύριος ρυθμιστής σηματοδότησης για την ενεργοποίηση B-λεμφοκυττάρων και την επακόλουθη ανάπτυξη χυμικής ανοσίας (118, 119). Το αντίσωμα IgG1 αντι-CD19 (MEDI-551) καταστρέφει τα πρώιμα B λεμφοκύτταρα και αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό στην εξάντληση B λεμφοκυτταρικού πληθυσμού στην περιφέρεια και στο σπλήνα, συγκριτικά με αντι-CD20 αντισώματα (119). Επίσης έχει ερευνηθεί ο προστατευτικός του ρόλος στο πειραματικό μοντέλο αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, καταστέλλοντας τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της νόσου και αυξάνοντας τα κυκλοφορούντα Bregs και Tregs (120). Στο πεδίο αυτό, μια διπλή-τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο φάσης 1 μελέτη (ClinicalTrials.gov study identifier: NCT01585766) ερευνά την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του MEDI-551 σε RRMS ασθενείς.

7 ΠΡΟΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ



Εικόνα 7.0.1: Μηχανισμός παρουσίασης πεπτιδίου από MHC μόριο στον TCR υποδοχέα.

Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής ανοσολογικής απόκρισης σε ένα ισχυρό παθογόνο, αντιγονο-ειδικά κύτταρα ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται έντονα, και εξαπλώνονται σε μεγάλο βαθμό. Αυτή η φάση εξάπλωσης δίνει ένα μεγάλο πληθυσμό ανοσοδραστικών T-κυττάρων. Στην παθογένεση της ΣκΠ, είναι απαραίτητη η συμμετοχή των T-κυττάρων και αυτό αποδείχθηκε κυρίως από την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα ΕΑΕ αλλά και από την ισχυρή συσχέτιση με γονίδια μείζονος ιστοσυμβατότητας τύπου II (MHC II) (121). Οι χαρακτηριστικές βλάβες της νόσου εμφανίζονται όταν τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν στον εγκέφαλο μέσω της διαταραγμένης λειτουργίας του ΑΕΦ, διαφοροποιηθούν σε Th1, Th2 και Th17 και συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις διεργασίες (122). Για μεγάλο χρονικό διάστημα τα αυτοδραστικά CD4⁺ T κύτταρα που εκκρίνουν ιντερφερόνη-γάμμα (IFN-γ), θεωρήθηκαν ότι είναι οι κύριοι μεσολαβητές της φλεγμονής και προκαλούν τις βλάβες στην ΣκΠ. Πλέον γνωρίζουμε ότι πολλοί άλλοι τύποι κυττάρων καθώς και υποπληθυσμοί κυττάρων συμμετέχουν επίσης, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα Th17 λεμφοκύτταρα. Το σύγχρονο ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάζει όμως στη σημασία των B λεμφοκυττάρων στην πορεία της νόσου, μέσω της αντιγονοπαρουσίασης σε αυτοδραστικά T-κύτταρα, της δημιουργίας αυτοαντισωμάτων και της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών (2, 123). Στη συνέχεια, για τους σκοπούς της ερευνητικής εργασίας, θα αναλυθούν οι προφλεγμονώδεις κυτταρικοί πληθυσμοί και οι μηχανισμοί με τους οποίους συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις διαδικασίες.

7.1 Th1

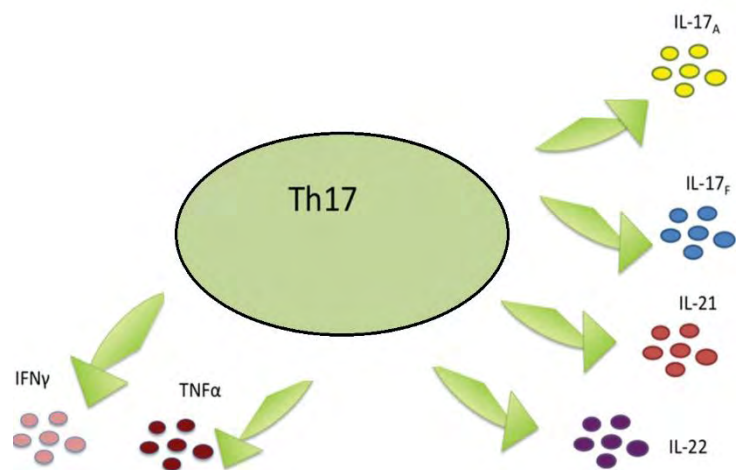
Αφότου εκτεθούν σε ένα αντιγόνο και ενεργοποιηθούν, εξαρτώμενα από το μικροπεριβάλλον και τα επιπλέον σήματα που θα λάβουν, τα T λεμφοκύτταρα θα διαφοροποιηθούν σε κύτταρα με διαφορετικό προφίλ κυτταροκινών και λειτουργικές δραστηριότητες. Τα CD4⁺ MHC τάξης II-περιορισμού T κύτταρα συνήθως αποκτούν τη λειτουργία βοηθητικών κυττάρων (T-helper). Διάφοροι υποπληθυσμοί Th κυττάρων και φάσεις διαφοροποίησής τους έχουν αναγνωρισθεί με βάση τους δείκτες επιφανείας που εκφράζουν, τους μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και τα δραστικά μόρια που εκκρίνουν ή τις λειτουργίες που εκτελούν και αναφέρονται ως Th1, Th2, Th17,

Th9 και Tfh (follicular helper, λεμφοζιδιακά T βοηθητικά) πληθυσμοί (124). Τα CD8⁺ MHC τάξης I-περιορισμού T κύτταρα είναι συνήθως κυτταροτοξικά (T cytotoxic) και μπορούν επίσης να διακριθούν σε υποπληθυσμούς όπως οι Tc1 και Tc2, που είναι οι περισσότεροι μελετημένοι αν και έχουν αναφερθεί και CD8⁺ κύτταρα που παράγουν IL-17 (125). Για τη διαφοροποίηση των Th1 κυττάρων, αλλά και την ενεργοποίηση άλλων κυτταρικών πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένων των NK κυττάρων απαιτείται η IL-12 που εκκρίνεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) όταν αυτά διεγερθούν (126). Χαρακτηριστικό του Th1 φαινοτύπου είναι η έκφραση των παραγόντων μεταγραφής Tbet, STAT4 και STAT1 και η έκκριση IFN- γ ενώ προωθούν και την ανοσία έναντι ενδοκυτταρικών παθογόνων (127). Η έκκριση IFN- γ από τα Th1 κύτταρα, προωθεί επίσης τη μετάπτωση της τάξης των αντισωμάτων IgG, γεγονός που επιδρά στις διαδικασίες της φαγοκυττάρωσης και της ενεργοποίησης του συμπληρώματος (128).

7.2 Th17

Τα κύτταρα Th17 ταυτοποιήθηκαν το 2005 (129) και έκτοτε έχει ερευνηθεί αρκετά ο ρόλος τους στην παθογένεση της αυτοανοσίας. Οι κυτταροκίνες που ρυθμίζουν την εξέλιξη των Th17 περιλαμβάνουν τις IL-6, IL-21, IL-23

και IL-1 β και πιθανά τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού βήτα (TGF- β), μέσω της ικανότητάς του να καταστέλλει την ανάπτυξη Th1 κυτταρικών πληθυσμών. Μολονότι η οικογένεια κυτταροκινών IL-17 περιλαμβάνει έξι μέλη, τα Th17 κύτταρα πιστεύεται ότι παράγουν μόνο



IL-17A και IL-17F (130). Σχετικά με την ΣκΠ, στον ορό και το

Εικόνα 7.2.1: Κυτταροκίνες που παράγονται από Th17 κύτταρα.

εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών που πάσχουν, τα Th17 κύτταρα εμφανίζονται σε αυξημένη συγκέντρωση σε σύγκριση με υγιή δείγματα (131). In vitro μελέτες αιματο-εγκεφαλικού φραγμού σε ανθρώπους έδειξε ότι τα Th17 κύτταρα μεταναστεύουν αποτελεσματικότερα σε σχέση με τα Th1 κύτταρα και έχουν νευροτοξική δράση (132). Ακόμη ανταπόκριση σε θεραπεία με Φιγκολιμόδη και Διμεθυλ-φουμαρικό οξύ έχει συσχετιστεί με μειωμένες Th17 κυτταρικές απαντήσεις (133). Επίσης η έκκριση του GM-CSF (παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων) από Th17 κύτταρα φαίνεται να διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση κυττάρων του ΚΝΣ (μικρογλοία, μακροφάγα, δένδριτικά κύτταρα), καθώς κύτταρα Th17 με ανεπάρκεια GM-CSF αδυνατούν να προκαλέσουν πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (134). Ας σημειωθεί ότι Th17 κύτταρα εκκρίνουν επίσης IL-21,

IL-22 και IL-21, οι οποίες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση και την επιβίωση των ανοσοκυττάρων και μπορούν να επηρεάσουν τα λεμφοκύτταρα που διεισδύουν σε οξεία χρόνιες αλλοιώσεις της λευκής ουσίας σε ασθενείς με ΣκΠ (135).

7.3 IL-18

Η IL-18 αναγνωρίστηκε αρχικά ως πρωτεΐνη στον ορό ποντικών που υποβλήθηκαν σε αγωγή με το βακτηρίδιο *Propionibacterium acnes* (136). Το γονίδιο IL-18 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 στο ποντίκι και στο χρωμόσωμα 11 στους ανθρώπους. Η παραγωγή IL-18 έχει ανιχνευθεί από μία ποικιλία κυττάρων όπως κύτταρα Kurpfer, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, κερατινοκύτταρα, χονδροκύτταρα, εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και οστεοβλάστες (137). Ένας πολυμορφισμός γονιδίου της IL-18 (IL-18 -607C/A) απεδείχθη ότι είναι σημαντικός γενετικός παράγοντας για εκδήλωση ευαισθησίας στη νόσο σε συνέργεια με το κάπνισμα. Επίσης ένα σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω IL-18Ra, είναι κρίσιμο για την έκκριση της IL-23p40, σημαντικού παράγοντα για διατήρηση παθογόνων T-λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν IL-17 (138). Σε σχέση με την κλινική πορεία της νόσου, ασθενείς με χρόνια προοδευτική μορφή της νόσου, εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα IL-18 στον ορό, σε σχέση με RRMS (139). Σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό από ασθενείς με οξεία ΣκΠ, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα κασπάσης-1 και σε ασθενείς με ΣκΠ που δεν έλαβαν καμία ανοσοτροποποιητική θεραπεία, mRNA και πρωτεϊνικά επίπεδα IL-18 ανιχνεύθηκαν αυξημένα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (140). Σε *in vitro* διέγερση PBMCs ασθενών με ΣκΠ με anti-CD3/CD28 παράχθηκαν υψηλές ποσότητες IL-18, ιδιαίτερα σε εκείνους που πάσχουν από SPMS. Τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα και όχι CD8⁺ κύτταρα ήταν υπεύθυνα μέσω αλληλεπίδρασης CD40-CD40L γι' αυτήν την παραγωγή IL-18, η οποία οδήγησε στη συνέχεια σε αύξηση της IFN-γ σε ασθενείς με ΣκΠ (141).

7.4 IL-12

Η IL-12 παράγεται κυρίως από μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και B κύτταρα. Οι κύριες λειτουργίες της περιλαμβάνουν την παραγωγή IFN-γ από NK και T κύτταρα, την ενίσχυση της κυτταροτοξικής δράσης των NK και κυτταροτοξικών T κυττάρων (CTLs) και τη διαφοροποίηση T κυττάρων σε Th1 φαινότυπο (142). Η IL-12 αποτελείται από δύο ομοιοπολικά συνδεδεμένες υπομονάδες, τις IL-12p35 και IL-12p40. Στην IL-12 τάξη κυτταροκινών ανήκουν οι IL-23 and IL-27 (143). Το κυριότερο λειτουργικό χαρακτηριστικό της IL-23 είναι ότι επάγει κύτταρα CD4 + Th17 για παραγωγή IL17 (144). Η οδός IL-23-IL-17 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο όσον αφορά την επαγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών που συμβάλλουν στην αυτοανοσία καθώς και σε προστατευτικές αποκρίσεις κατά των μολύνσεων (145).

Στη ΣκΠ, η αυξημένη έκφραση CD40L στα T λεμφοκύτταρα ενεργοποιεί τα APCs μέσω του μορίου CD40 και αυτό προκαλεί έκκριση IL-12 από τα APCs (146). Η IL-12 στη συνέχεια δρα επί των T κυττάρων για να επάγει την έκκριση της IFN-γ (146). Η παραγωγή της IFN-γ από NK

και T κύτταρα εξαιτίας της δράσης της IL-12 είναι ουσιώδης για την ανοσία. Αφού εκκρίνεται, η ίδια η IFN- γ δρα σε APCs για περαιτέρω ρύθμιση της έκκρισης IL-12 και διαιωνίζει τον κύκλο που οδηγεί σε Th1 κυτταρική απάντηση και φλεγμονή (147). Στο μοντέλο πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, οι ποντικοί που υποβλήθηκαν σε αγωγή με IL-12 *in vivo*, εμφάνισαν πιο σοβαρή και παρατεταμένη μορφή της νόσου (148). Η αυξημένη παραγωγή της IL-12 σε ασθενείς με ΣκΠ, σχετίζεται τόσο με την αυξημένη παραγωγή της IFN- γ , όσο και με την ενεργότητα της νόσου. Στα PBMCs ασθενών με επιθετική μορφή της νόσου, έχουν αναφερθεί μεγάλες ποσότητες IL-12 (146), καθώς και στο ENY ασθενών με υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου (149).

7.5 IFN- γ

Η κυτταροκίνη IFN- γ (ιντερφερόνη γάμμα) ανήκει στην οικογένεια ιντερφερονών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ικανότητα του κυττάρων να προστατεύονται από ιικές λοιμώξεις. Τα μόρια της IFN- γ έχουν διαιρεθεί σε δύο ξεχωριστές κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία ονομάζεται τύπου I IFN και περιλαμβάνει τα μόρια IFN- α και IFN- β , τα οποία είναι οι κλασικές ιντερφερόνες που επάγονται σε απόκριση σε ιογενείς λοιμώξεις. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται αποκλειστικά από IFN- γ (που ονομάζεται επίσης τύπος II ή ανοσοποιητική IFN), η οποία δεν σχετίζεται με την IFN τύπου I τόσο στο γενετικό όσο και στο πρωτεϊνικό επίπεδο. Αν και η IFN- γ έχει μια χαμηλότερη ειδική αντι-ιική δραστηριότητα, παρουσιάζει περισσότερες ανοσοδιαμορφωτικές ιδιότητες από τις ιντερφερόνες τύπου I (150). Η IFN- γ εκκρίνεται κυρίως από τα T κύτταρα και φυσικά (NK) κύτταρα, αλλά και επίσης από τα B-κύτταρα, APCs και κύτταρα T (NKT) φυσικού φονέα. Τα κύτταρα Th1 εκκρίνουν ισχυρά IFN- γ και TNF- α (151). Βασική δράση της IFN- γ είναι η προαγωγή της διαφοροποίηση των Th κυττάρων προς Th1 και η αναχαίτηση της επέκτασης του Th2 πληθυσμού. Η δράση αυτή επιτελείται μέσω αύξησης της παραγωγής IL-12 από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα και της ενεργοποίησης του υποδοχέα της IL-12 στα T κύτταρα (151). Στο ΚΝΣ, η IFN- γ αυξάνει την έκφραση των μορίων MHC (152) και επηρεάζει άμεσα την ενεργοποίηση και τη βιωσιμότητα άλλων κυττάρων. Με την αύξηση της έκφρασης των μορίων MHC, η IFN- γ πιστεύεται ότι ενισχύει την ικανότητα εμφάνισης ειδικού για την μυελίνη αντιγόνου. Στην ΣκΠ, έχουν συσχετιστεί τα επίπεδα της IFN- γ με τη συχνότητα ενεργών αλλοιώσεων (153). Επίσης φάνηκε να αυξάνεται η παραγωγή της IFN- γ από τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα λίγο πριν την επιδείνωση της νόσου (154). Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που δείχνει τη συσχέτιση της IFN- γ με τη ΣκΠ, είναι ότι αρκετοί γενετικοί πολυμορφισμοί της IFN- γ προκαλούν ευαισθησία (155). Ακόμη η IFN- γ δύναται να δρα καταστροφικά για τα ολιγοδενδροκύτταρα (156) και να ενεργοποιεί την μικρογλοία. Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί καθιστούν την IFN- γ σημαντικό παράγοντα προς μελέτη για την ΣκΠ.

7.6 IL-17

Η IL-17 είναι υπεύθυνη κυρίως για την άμυνα έναντι εξωκυττάρων βακτηρίων και μυκητών και ασκεί τις ιδιότητές μέσω ενός υποδοχέα που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους τύπους των κυττάρων (157). Αν και η κυτταρική απάντηση στην IL-17 διαφέρει ανάλογα με το κύτταρο-στόχο, γενικά η IL-17 προάγει την ανοσοποιητική της δράση συνεργαζόμενη με άλλες κυτταροκίνες και αυξάνει την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-6 και TNF-α), διάφορες χημειοκίνες (CXCL8, CXCL2 και CCL20) και πρωτεΐνες τελεστές (συμπλήρωμα) (158). Με αυτόν τον τρόπο διατηρεί τον φαινότυπο Th17, αλλά επίσης ενεργοποιεί την μικρογλοία και κινητοποιεί λειτουργικά ουδετερόφιλα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (159). Δεδομένα από ασθενείς με ΣκΠ συνδέουν έντονα την νόσο με αυτήν την κυτταροκίνη. Στην περιφέρεια και στο ΚΝΣ ασθενών σε υποτροπή εντοπίζονται μεγάλες ποσότητες mRNA IL-17 (160), γεγονός το οποίο έχει συνδεθεί ισχυρά με την ενεργότητα της νόσου. Ακόμη αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης ανίχνευσαν αυξημένη παραγωγή IL-17 σε ενεργές βλάβες της νόσου, εν αντιθέσει με τις ανενεργές (135).

7.7 B-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

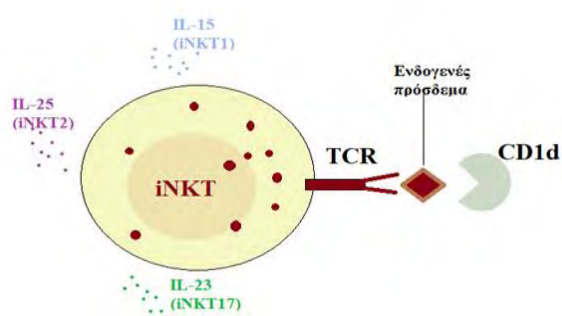
Τα B-λεμφοκύτταρα μπορούν να συνεισφέρουν στην παθογένεση της ΣκΠ με ποικίλους τρόπους με τον ρόλο των αντισωμάτων που παράγονται από τα διαφοροποιημένα κύτταρα πλάσματος, να έχει μελετηθεί εκτενώς. Τα παραγόμενα αντισώματα και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, αποδεδειγμένα συμβάλλουν στην απομυελίνωση του ΚΝΣ (161). Εκτός όμως ότι δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και παράγουν απομυελινωτικά αντισώματα, τα B-λεμφοκύτταρα δύναται να ρυθμίζουν φλεγμονώδεις διαδικασίες μέσω παραγωγής κυτταροκινών, όπως σημαντικές ποσότητες IL-6 (162). Η IL-6, που παράγεται από τα B-λεμφοκύτταρα έχει συνδεθεί με την παθογένεια της ΣκΠ (163). Επίσης δομές που μοιάζουν με B-λεμφικά θυλάκια, T λεμφοκύτταρα και APCs έχουν ανιχνευθεί στις μήνιγγες ασθενών σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου (SPMS αλλά όχι σε PPMS) (164). Μοριακή ανάλυση των B-λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ και των βλαβών στην ΣκΠ, έδειξε κλωνική επέκταση, σωματική υπερμετάθεση και αντιγονική διέγερση (165). Η εμπλοκή των B-λεμφοκυττάρων στην ΣκΠ αποκτά μεγαλύτερο ενδιαφέρον αν εξετάσει κάποιος την ικανότητά τους να ρυθμίζουν προς τα κάτω τις ανοσολογικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, η δημιουργία ρυθμιστικών B-λεμφοκυττάρων σε ποντίκια έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται από την παρουσία αλληλεπιδράσεων IL-21 και T κυττάρων μέσω CD40 / CD40L (166). Αν και η ισχυρότερη συσχέτιση των B λεμφοκυττάρων με την παθογένεση της ΣκΠ είναι η ύπαρξη ανοσοσφαιρινών G1 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε περίπου του 95% των ασθενών, πολλές μελέτες πρέπει ακόμα να γίνουν για να διαλευκανθεί ο παθογενετικός τους ρόλος.

7.8 NK ΚΑΙ NKT ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κύτταρα φυσικοί-φονείς (Natural killer cells-NK) είναι μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα που έχουν την ικανότητα να λύουν αυθόρμητα κύτταρα στόχους χωρίς προηγούμενη ευαισθητοποίηση. Αποτελούν 10-15% των κυττάρων του περιφερικού αίματος, ανευρίσκονται όμως φυσιολογικά και σε λεμφικά όργανα, όπως στο σπλήνα, σε λεμφαδένες και σε μη σπληνικά όργανα όπως ο πλακούντας. Λειτουργικά, αυτά τα κύτταρα είναι σημαντικά για την άμυνα του οργανισμού σε ιογενείς λοιμώξεις, καθώς επίσης και στον έλεγχο των όγκων (167). Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν και ενεργοποιούνται από κυτταρικούς-στόχους που βρίσκονται σε κατάσταση κινδύνου, ανιχνεύοντας σε αυτά συνδέτες επαγόμενους από στρες μέσω φυσικών υποδοχέων κυτταροτοξικότητας, καθώς και ο τύπου C υποδοχέας της λεκτίνης NKG2D, μεταξύ άλλων (168). Ως δείκτες αναγνώρισής τους, χρησιμοποιούνται τα CD56 και CD16, ενώ ως NK κύτταρα χαρακτηρίζονται τα CD3- (CD16 ή/και CD56)+ κύτταρα (169). Τα κύτταρα NK εκφράζουν πολυάριθμους υποδοχείς που αναστέλλουν την ενεργοποίησή τους, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας υποδοχέων KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor). Ελλείψει αυτών των προσδετών, τα κύτταρα NK ενεργοποιούνται και θανατώνουν κύτταρα στόχους (170).

Ο ρόλος των NK στις αυτοάνοσες νόσους είναι αδιευκρίνιστος μέχρι σήμερα. Στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα η εξάντληση των NK κυττάρων οδήγησε σε σοβαρή υποτροπιάζουσα νόσο και σε πιο εκτεταμένη βλάβη στο ΚΝΣ (171). Τα ποντίκια που είχαν έλλειψη σε έναν υποδοχέα (CX3CR1), απαραίτητο για την πρόσληψη των κυττάρων αυτών στο ΚΝΣ εμφάνισαν πιο επιθετική μορφή της νόσου (172). Στο ίδιο μοντέλο παρατηρήθηκαν αυξημένες αποκρίσεις από Th17 κύτταρα τοπικά στο ΚΝΣ, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο για τα κύτταρα NK στην ανακοπή αυτών των κυττάρων (173). Αντίθετα στην επαγόμενη από MOG-ειδικά CD4 T λεμφοκύτταρα αυτοάνοση πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα, εξάντληση NK κυτταρικών αποθεμάτων βελτίωσε τη νόσο (174).

Τα T-κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural killer T-cells NKT), αποτελούν μια υποομάδα T λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν αντιγόνα λιπιδίων ή γλυκολιπιδίων που παρουσιάζονται μέσω της πρωτεΐνης CD1d που σχετίζεται με την τάξη MHC I (175). Διακρίνονται από τα NK κύτταρα



Εικόνα 7.8.1: Αμετάβλητα NKT κύτταρα (iNKT) και κυτταροκίνες που σχετίζονται με αυτά.

τα οποία αποτελούν μέρος φυσικής ανοσίας και διαθέτουν ανασταλτικούς μηχανισμούς για την καταστροφή ίδιων αντιγόνων μέσω της αναγνώρισης MHC μορίων επιφανείας από υποδοχείς (killer inhibitory receptors – KIR). Τα φυσιολογικά όρια των NKT στο περιφερικό αίμα δεν είναι σταθερά και κάθε άτομο έχει διαφορετικά επίπεδα. Δύο υποσύνολα NKT

κυττάρων έχουν ταυτοποιηθεί, τα τύπου I ή αμετάβλητα κυττάρων NKT (iNKT) και τύπου II ή μεταβλητά (vNKT). Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι τα iNKT κύτταρα (**Εικόνα 7.8.1**) μειώνονται στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣκΠ (176). Σε υποτροπιάζοντες ασθενείς υπό θεραπεία με IFN- β , η λειτουργία των NKT κυττάρων αποκαταστάθηκε (177). Μια μετατόπιση κυτταροκινών σε φαινότυπο Th2 στα κύτταρα iNKT, παρατηρήθηκε σε ασθενείς θεραπευόμενους με κορτικοστεροειδή από του στόματος, υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα αυτά, μπορούν να ασκήσουν ανοσορυθμιστικές επιδράσεις με παραγωγή κυτταροκινών Th2 φαινοτύπου (178). Το κύριο εύρημα της σύνδεσης vNKT κυττάρων με ΣκΠ είναι ότι ένα υποσύνολο αυτών των κυττάρων ποντικού είναι ειδικό για ένα κύριο συστατικό της μυελίνης (179). Παρόλα αυτά δεν έχουν αναφερθεί ακόμα μελέτες vNKT κυττάρων σε ασθενείς με ΣκΠ.

8 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ

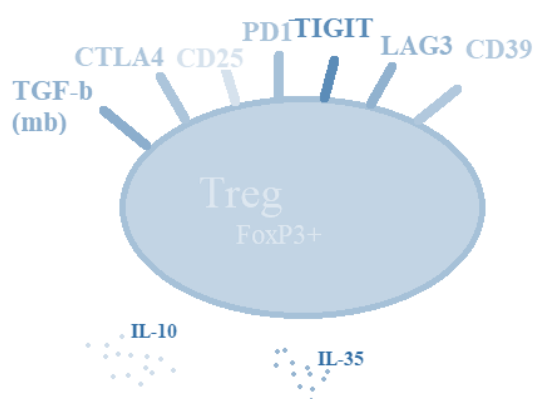
Η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές αυτοάνοσες ασθένειες, αλλεργίες, κακοήθειες και μεταμοσχεύσεις οργάνων. Πλήθος ερευνητικών μελετών έχουν αναφερθεί στην κατασταλτική δράση των ρυθμιστικών T και B λεμφοκυττάρων (Tregs, Bregs) καθώς και των ρυθμιστικών μυελοειδών κυττάρων (180). Σε υγιή άτομα, διατηρούνται τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα υπό έλεγχο, ενώ στην ΣκΠ η ισορροπία αυτή απορυθμίζεται με αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου με τις χαρακτηριστικές απομυελινωτικές αλλοιώσεις του ΚΝΣ. Τα Tregs και Bregs βρίσκονται στο στόχαστρο πολλών ερευνητικών ελέγχων και διερευνάται ο ρόλος τους σε αυτοάνοσες παθήσεις, μεταξύ των οποίων και η ΣκΠ. Η φαινοτυπική αναγνώριση και ενδεδειγμένη μελέτη του μηχανισμού δράσης αυτών των κυττάρων, προάγει την κατανόηση της παθογένειας της νόσου και προσφέρει νέες θεραπευτικές προοπτικές.

8.1 Tregs

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970, η ερευνητική υπόθεση των Gershon et al. υποστήριξε ότι ένα υποσύνολο T κυττάρων δύναται να ασκεί κατασταλτική δραστηριότητα σε μια ανοσολογική αντίδραση και ο όρος κατασταλτικά κύτταρα υιοθετήθηκε και ξεκίνησε να χρησιμοποιείται πιο διαδεδομένα (181). Παρά την ύπαρξη επιστημονικών αμφισβητήσεων, αρκετά πειράματα έδωσαν σαφείς ενδείξεις ότι τέτοια κύτταρα πράγματι υπάρχουν. Το 1995 οι Sakaguchi et.al ταυτοποίησαν ένα υποσύνολο των CD4⁺ λεμφοκυττάρων, καθοριζόμενο από τον επιφανειακό δείκτη CD25, με ανοσοκατασταλτική δράση (182). Σύμφωνα με τους παραπάνω συγγραφείς, αυτά τα CD4⁺CD25⁺ T κύτταρα εμφάνισαν ισχυρές ρυθμιστικές λειτουργίες τόσο in vivo, όσο και in vitro. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι αυτά τα κύτταρα εκφράζουν κυτταροτοξικό T λεμφοκυτταρικό αντιγόνο-4 (CTLA-4) (183) και ταυτοποιήθηκε ο φαινότυπός τους με την ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 (184). Τελικώς, τα Tregs μπορούν να αναγνωριστούν με

ακρίβεια ως κύτταρα CD4+CD25+FoxP3+ ή (εφόσον ο FoxP3 έχει μία αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του επιφανειακού CD127) CD4+CD25+CD127^{lo/-} T λεμφοκύτταρα (185).

Τα φυσικά Tregs (nTregs) προκύπτουν από θυμοκύτταρα κατά τη διάρκεια αρνητικής επιλογής στον θύμο αδέν. Εκεί, κύτταρα με ενδιάμεση συγγένεια για τα αντιγόνα του θύμου που εκφράζουν το FoxP3 μετατρέπονται σε Tregs (219). Τα nTregs εκφράζουν είτε CD45RA⁺, τα οποία είναι άωρα, είτε CD45RO⁺ και ταξινομούνται ως μνήμης (220). Υπάρχει και ένας άλλος τύπος Tregs κυττάρων, τα επαγωγίμα Tregs (iTregs), τα οποία προκύπτουν από άωρα T λεμφοκύτταρα ποντικού παρουσία αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β) ή ρετινοϊκού οξέος (221). Ένας άλλος υπότυπος iTregs κυττάρων, τα CD4⁺Foxp3⁻, προκύπτουν από την χρόνια αντιγονική ενεργοποίηση CD4⁺ κυττάρων και αποτελούν τα ρυθμιστικά T κύτταρα τύπου 1 (Tr1) (222). Τα Tregs ρυθμίζουν την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και καταστέλλουν ανεπιθύμητες αυτοδραστικές αποκρίσεις μέσω ελέγχου των κυττάρων-τελεστών (Effector Cells). Αυτή την ρύθμιση



Εικόνα 8.1.1: Επιφανειακά μόρια και κυτταροκίνες των Tregs κυττάρων.

μηχανισμούς όπως την καταστολή μέσω διακυτταρικής επαφής, την παραγωγή κατασταλτικών διαμεσολαβητών (IL-10, TGF-β), την διαμόρφωση της λειτουργίας των δενδριτικών κυττάρων (APCs) και την κυτταρική λύση (186).

Όσον αφορά τα Tregs και τη συσχέτισή τους με την ΣκΠ, έρευνες έχουν διεξαχθεί τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια. Στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα η εξάντληση των CD25⁺ T λεμφοκυττάρων σε ποντίκια, μείωσε το απαραίτητο αντιγονικό φορτίο για την πρόκληση της νόσου και παράλληλα αναχαίτησε την αποκατάσταση από την νόσο (187). Οι Fletcher et al., το 2010 απέδειξαν ότι ο αριθμός των Tregs σε ασθενείς με ΣκΠ παραμένει σταθερός (188). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι αυτή η διαταραχή ισορροπίας και βλάβη στην δραστηριότητα των κυττάρων αφορά κυρίως τους ασθενείς με RRMS (189). Ένας άλλος μηχανισμός δυσλειτουργίας των Tregs κυττάρων αφορά τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, πολλές από τις οποίες δρουν διαφορετικά σε ασθενείς με ΣκΠ. Η IL-12, η οποία εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στους νοσούντες (146), ωθεί τα Tregs να παράγουν IFN-γ οδηγώντας σε μείωση της κατασταλτικής τους δραστηριότητας. Περαιτέρω ευρήματα συνδέουν τα κύτταρα Tr1

με την παθογένεια της νόσου, καθώς και με άλλες δυσλειτουργίες σε ρυθμιστικούς πληθυσμούς Τ κυττάρων (190).

8.2 Bregs

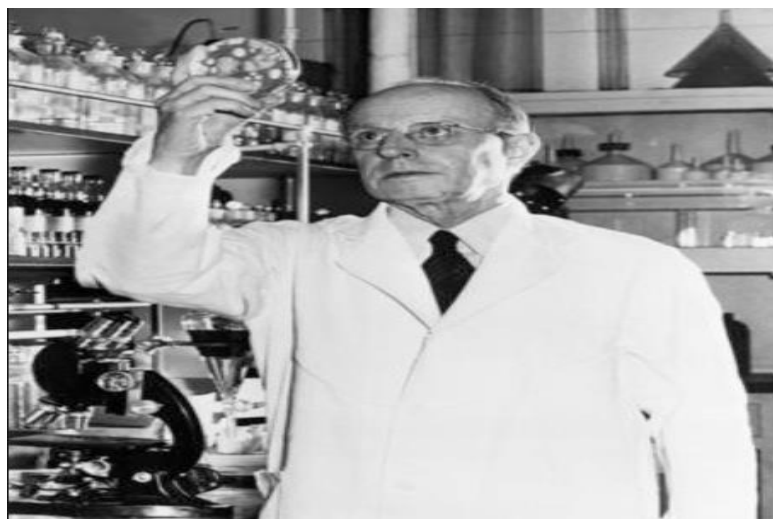
Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει τον σημαντικό ρόλο των ρυθμιστικών Β λεμφοκυττάρων (Bregs) στην παθογένεια αυτοανοσων νόσων μεταξύ των οποίων και η ΣκΠ (191, 192). Τα Bregs αποτελούν ένα υποσύνολο Β-λεμφοκυττάρων που ενέχουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική ρύθμιση, κυρίως μέσω της παραγωγής IL-10 αλλά και με μηχανισμούς ανεξάρτητους από αυτήν (193). Εκτός από την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα και την παραγωγή αντισωμάτων, ένα κοινό Β προγονικό κύτταρο έπειτα από αντιγονική αναγνώριση μέσω Toll-Like Receptor (TLR), μπορεί να διαφοροποιηθεί σε ρυθμιστικό-κατασταλτικό κύτταρο Breg. Η περαιτέρω ενεργοποίηση των Bregs οδηγεί σε παραγωγή IL-10, η οποία είναι απαραίτητη για την μετέπειτα διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των Foxp3⁺ Tregs και Tr1 κυτταρικών πληθυσμών (194). Τόσο ο αριθμός όσο και η λειτουργικότητα τους καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την απόκριση και κατασταλτική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι διαφόρων ερεθισμάτων (233). Σε αντίθεση με τα Tregs τα οποία εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP3 για τα Bregs δεν έχει προκύψει συγκεκριμένος φαινότυπος που να τα καθορίζει επαρκώς με τους μηχανισμούς τους να έχουν μελετηθεί με τρόπο εξαρτώμενο από την εκάστοτε αυτοάνοση ασθένεια. Εξαιτίας της έλλειψης επιφανειακών μοριακών δεικτών, τα Bregs καθορίζονται κυρίως από την ικανότητά τους να παράγουν IL-10 και ονομάζονται B10 κύτταρα (234).

Στην ΣκΠ, ο ρόλος που διαδραματίζουν τα Β κύτταρα, έχει μελετηθεί κυρίως στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, όπου τα ποντίκια με γενετικά ελλείμματα των Β κυττάρων αδυνατούν να αναρρώσουν από την νόσο (191). Στην ίδια βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η μεταφορά σε νοσούντα ποντίκια Β λεμφοκυττάρων τα οποία παράγουν IL-10 καταστέλλει τα συμπτώματα της νόσου. Όπως προκύπτει (195), τα Bregs καταστέλλουν την ανάπτυξη της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, εμποδίζοντας την δράση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και τη μετανάστευση ενεργοποιημένων κυττάρων στο ΚΝΣ (195, 196). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ένα τύπος Bregs κυττάρων, τα CD19⁺CD25⁺ Bregs, τα οποία εντοπίστηκαν τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς με ΣκΠ. Φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με τον αριθμό αυτού του τύπου κυττάρων και της ΣκΠ, καθώς ο αριθμός τους είναι αυξημένος τόσο σε ασθενείς, όσο και σε υποτροπές της νόσου (196). Τα ευρήματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ομοφωνία, όσον αφορά τον αριθμό των Bregs σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα. Η άλλοτε σημαντική μείωση των Bregs στην ΣκΠ (197), ή η αριθμητική τους σταθερότητα, αποτελούν ενδιαφέροντα ερευνητικά πεδία και είναι υπό συζήτηση. Το μόνο βέβαιο είναι ότι στην ΣκΠ, η λειτουργία των Bregs επηρεάζεται, με την παραγωγή της IL-10 από τα Β λεμφοκύτταρα να είναι χαρακτηριστικά μειωμένη (198). Παράλληλα, στις υποτροπές της

νόσου παρατηρείται και αυξημένη αναλογία μνημονικών/άωρων Bregs (197). Πάντως λίγες μελέτες έχουν χαρακτηρίσει μέχρι στιγμής Bregs πληθυσμούς στην ΣκΠ, δείχνοντας ή όχι διαφορά σε μείωση πληθυσμού υποομάδων Bregs που παράγουν IL-10 σε σχέση με υγιή άτομα (199, 200).

9 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

Οι Τετρακυκλίνες (TCs) ανήκουν στην κατηγορία αντιβιοτικών ευρέως φάσματος λόγω της υψηλής δραστηριότητάς τους έναντι διαφόρων τύπων βακτηρίων, τόσο gram-θετικών (*actinomyces israelii*, *listeria monocytogenes*, *staphylococcus*, *streptococcus*, *pneumococcus*, *enterococcus*), όσο και gram-αρνητικών (*legionella pneumophila*, *mycoplasma*, *neisseria meningitidis*, *gonococcus*, *dysentery bacillus*, *brucella*, *cholera*) καθώς και άλλων μικροοργανισμών και πρωτόζωων παρασίτων (201). Οι TCs ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του 1940 και το ευρύ πεδίο της αντιμικροβιακής-βακτηριοστατικής τους δραστηριότητας παράλληλα με την απουσία σημαντικών παρενεργειών τις έχουν κατατάξει στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά με επεκτάσεις, εκτός της Ιατρικής στην γεωργία και την κτηνοτροφία ήδη από το 1950 (201). Η χλωροτετρακυκλίνη ήταν το πρώτο αντιβιοτικό της κατηγορίας που απομονώθηκε το 1940 από

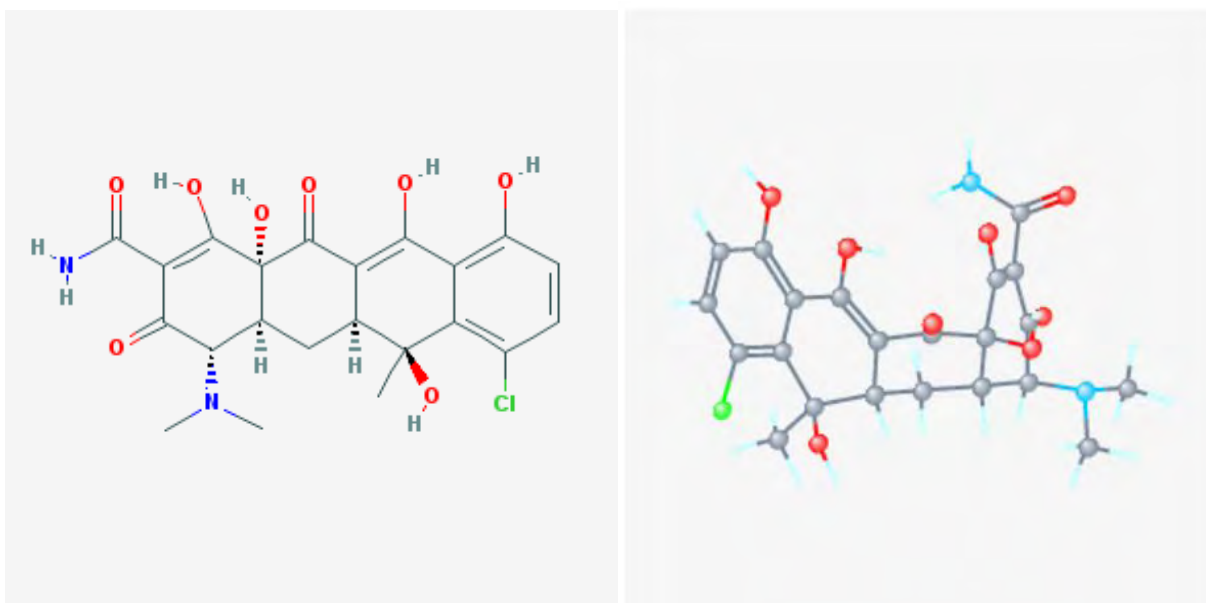


τον Benjamin M. Duggar (202). Ο Duggar (Εικόνα 9.1) αναγνώρισε το αντιβιοτικό ως προϊόν ενός ακτινομύκητα που καλλιεργήθηκε από ένα δείγμα εδάφους και συλλέχθηκε στο Πανεπιστήμιο του Μισσούρι.

Στις ακόλουθες δύο δεκαετίες ανακαλύφθηκαν και άλλα μέλη της ομάδας των TCs, τα οποία απομονώθηκαν απο μύκητες, είτε παρήχθησαν ημισυνθετικά, όπως η

Εικόνα 9.0.1: Ο Benjamin M. Duggar, εφευρέτης των τετρακυκλινών.

μινοκυκλίνη, η δοξυκυκλίνη και η μετακυκλίνη. Τέλος την δεκαετία του 1990, η ανακάλυψη μιας νέας γενιάς TCs, των γλυκοκυκλινών (με κύριο εκπρόσωπο την τριγεκυκλίνη), συνέβαλε στην επίλυση του προβλήματος της ανθεκτικότητας πολλών μικροοργανισμών στις TCs (203). Τα μοναδικά χημικά και βιολογικά τους χαρακτηριστικά και η δυνατότητά τους να αλληλοεπιδρούν με ποικίλους κυτταρικούς στόχους και υποδοχείς τις καθιστούν στόχο πολλών ερευνητικών δοκιμών από την παγκόσμια ιατρική κοινότητα.



Εικόνα 9.0.2: Η χημική δομή της χλωροτετρακυκλίνης ($C_{22}H_{23}ClN_2O_8$) σε δισδιάστατο (αριστερά) και τρισδιάστατο (δεξιά) μοντέλο. Αναρτημένο από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

9.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

Αντιμικροβιακή δράση

Η πλειονότητα των αντιβιοτικών αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων παρεμποδίζοντας την λειτουργία διαφόρων μορίων-στόχων, στο εσωτερικό του κυττάρου ή στην κυτταρική επιφάνεια. Οι TCs παρεμποδίζουν την διεξαγωγή ενζυμικών αντιδράσεων απαραίτητων για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση και οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (204). Πιο συγκεκριμένα οι TCs δρουν εμποδίζοντας την έναρξη της πρωτεϊνικής σύνθεσης με αναστολή δέσμευσης αμινοακυλικού tRNA στην A θέση του ριβοσώματος. Η πρωτεΐνη 7S και το 16S RNA εμφανίζουν την μεγαλύτερη συγγένεια με τις TCs αποτελώντας τους κύριους στόχους (201). Η δέσμευση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση ενός νέου αμινοακυλικού tRNA στο ριβόσωμα (205). Με αυτόν τον τρόπο παρεμβαίνουν στη σύνθεση νέων πρωτεϊνών, εμποδίζοντας την εισαγωγή αμινοξέων στην εκκλαπτόμενη πεπτιδική αλυσίδα.

Η κύρια θέση δέσμευσης των TCs σχηματίζεται από την μικρή αύλακα της έλικας 33 και τον θύλακα της έλικας 31 στο 16S rRNA (206). Το πολωμένο άκρο των TCs αλληλοεπιδρά με φωσφορικά κατάλοιπα της έλικας 34 και ένα ιόν μαγνησίου, το οποίο επιτρέπει βιοχημικές αλληλεπιδράσεις με άλλα ιόντα. Ένα δεύτερο ιόν μαγνησίου συντονίζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των TCs και της έλικας 31 (206). Εκτός από τη στόχευση των TCs στο βακτηριακό ριβόσωμα, έχει αναφερθεί επίσης ένας θύλακα δέσμευσης στον θερμικό ασταθή παράγοντα επιμήκυνσης (EF-Tu), επηρεάζοντας την λειτουργία του μέσω διάσπασης νουκλεοτιδίων (207).

Ας σημειωθεί ότι η σύνδεση των TCs με το ριβόσωμα είναι αναστρέψιμη, αιτιολογώντας την βακτηριοστατική δράση αυτών των αντιβιοτικών (208). Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ότι ορισμένες τετρακυκλίνες έχουν βιοχημικές δραστηριότητες και μπορούν να δρουν βακτηριοκτόνα, επηρεάζοντας την κυτταρική ανάπτυξη. Τέτοιες τετρακυκλίνες είναι οι λιπόφιλες, οι οποίες απεδείχθη ότι μπορούν να διαχέονται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης Gram-βακτηρίων με βάση την ηλεκτροχημική κλίση (201).

Ιοντοφόρος δράση

Ο TCs χαρακτηρίζονται ως ιοντοφόρα, οργανικές ενώσεις δηλαδή ικανές να σχηματίζουν διαλυτά συμπλέγματα λιπιδίων με μεταλλικά κατιόντα. Δεσμεύοντας δισθενή μεταλλικά ιόντα κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος ως χηλικά Ca^{++} και Mg^{++} (209). Μετά από την ενδοκυτταρική του ενσωμάτωση, το Ca^{++} μπορεί να δράσει ως δευτερεύων αγγελιοφόρος και να επηρεάσει πολλές κυτταρικές μεταβολικές αντιδράσεις.

Πρωτεϊνολυτική δράση

Η τετρακυκλίνη και τα ανάλογά της, αναστέλλουν τις μάρτιξ μεταλλοπρωτεάσες (MMPs), οι οποίες είναι εξαρτώμενες από ψευδάργυρο ενδοπεπτιδάσες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές ρυθμιστικές λειτουργίες όπως στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή και την αναδιαμόρφωση των ιστών, καθώς και σε ασθένειες όπως στην αρθρίτιδα και σε μεταστάσεις (210). Υπάρχουν MMPs που διασπούν ινιδικά κολλαγόνα γνωστά ως κολλαγονάσες (MMP -1, MMP-8, MMP-13) και αυτά που μπορούν να επηρεάσουν το κολλαγόνο βασικής μεμβράνης (κολλαγόνο IV) γνωστό ως ζελατινάσες (MMP-2, MMP-9). Η τετρακυκλίνη και τα ανάλογα της μπορούν να αναστείλουν και τις δύο κολλαγενάσες και τις ζελατινάσες (211).

Αντιαγγειογενετική δράση

Η δοξυκυκλίνη και η μινοκυκλίνη αναστέλλουν τη σύνθεση των MMPs (MMP-8, MMP-9) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (211). Αυτή η αναστολή, που παρατηρείται στα επίπεδα πρωτεϊνών και mRNA, μπορεί να επηρεάσει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης. Συνεπώς η δράση τους μπορεί να είναι θεραπευτική σε παθήσεις φλεγμονώδους διεργασίας που συνοδεύονται από σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων.

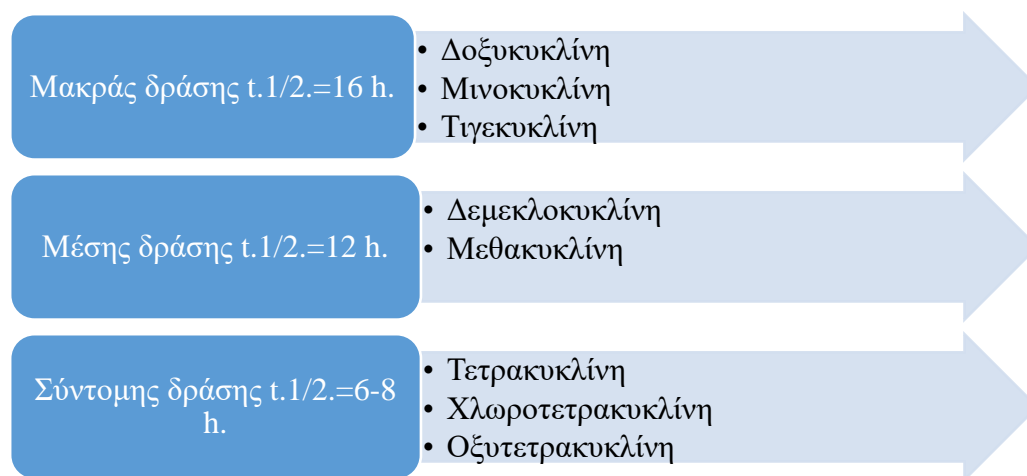
Δράση στον μεταβολισμό οστών

Σε ζωικά πειραματικά μοντέλα, η δοξυκυκλίνη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την σοβαρότητα της οστεοαρθρίτιδας κυρίως μέσα από αναστολή του πολλαπλασιασμού και της υπερτροφίας των χονδροκυττάρων (211). Πειραματικά μοντέλα σε αρουραίους, όσον αφορά την μινοκυκλίνη έδειξαν ότι επιδρά θετικά στον σχηματισμό νέων οστών και στη διατήρηση της πυκνότητάς τους (212). Η δράση της αυτή ίσως εξηγείται από τη μείωση της λειτουργίας των οστεοκλαστών.

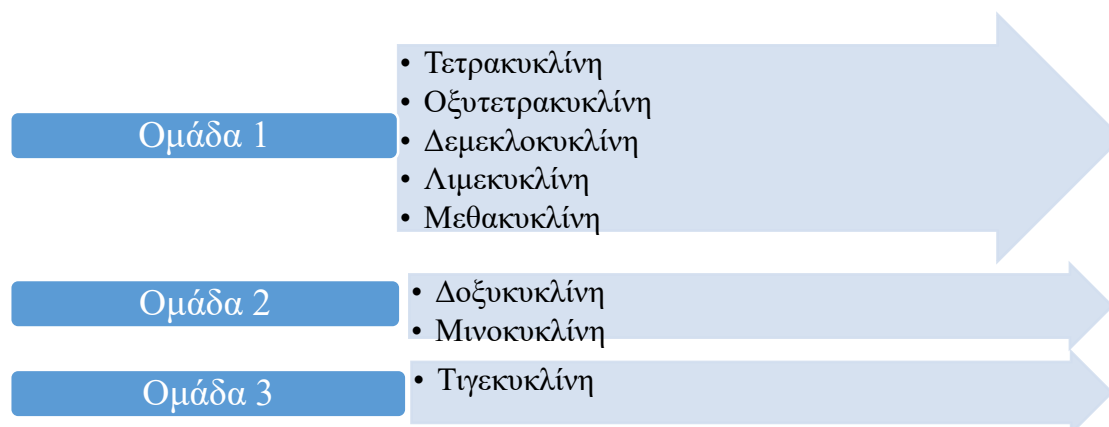
Παράλληλα, οι TCs εμφανίζουν σημαντική ανοσοτροποποιητική δράση, οι οποίες θα συζητηθεί εκτενώς παρακάτω σε ξεχωριστή ενότητα.

9.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ

Ανάλογα με τον χρόνο δράσης τους, ο οποίος προσδιορίζεται από την ταχύτητα απέκκρισης του φαρμάκου από τον οργανισμό και μας δίνει τον χρόνο ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$), οι TCs χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, όπως φαίνεται από το ακόλουθο σχήμα:

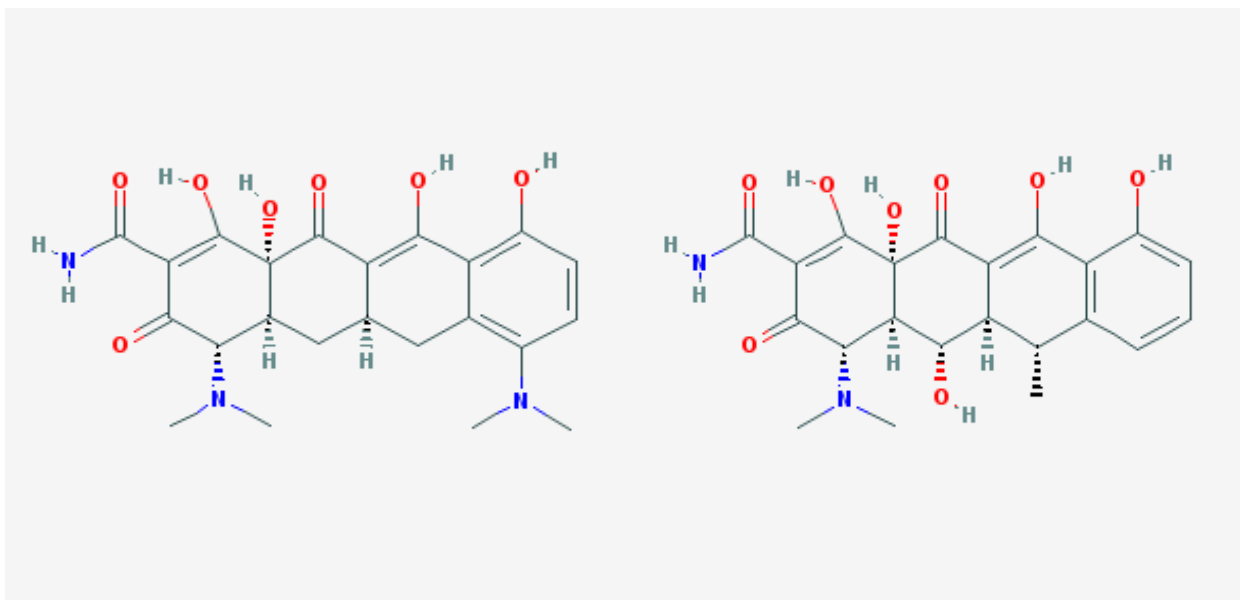


Μία άλλη κατηγοριοποίηση αφορά ομάδες των TCs με διαφορετική φαρμακοκινητική συμπεριφορά (213). Η ταξινόμηση αυτή γίνεται εμφανής στο παρακάτω σχήμα:



Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, θα γίνει αναφορά στη φαρμακοκινητική συμπεριφορά της ομάδας 2 του σχήματος (δοξυκυκλίνη και μινοκυκλίνη).

Η απορρόφηση της δοξυκυκλίνης γίνεται με μια βιοδιαθεσιμότητα της τάξης των 80% με μέσο όρο 95%, η οποία προσεγγίζει την πλήρη απορρόφηση (214). Άλλοι συγγραφείς παρόλα αυτά θεωρούν ότι η απορρόφηση της δοξυκυκλίνης γίνεται σε μικρότερο ποσοστό, 73-77%. Η απορρόφηση του φαρμάκου λαμβάνει χώρα στο δωδεκαδάκτυλο (214). Η μέγιστη συγκέντρωση (C_{max} mg/L) ποικίλει με τη δόση να είναι 15,3 mg/L 4 ώρες μετά από δόση 500 mg φαρμάκου από του στόματος (per os). Όσον αφορά τη διείσδυση του φαρμάκου στους ιστούς, υψηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν στο ήπαρ, τους νεφρούς και τον πεπτικό σωλήνα. Δεν υπάρχει σημαντικός μεταβολισμός και περίπου το 35-60% απεκκρίνεται στα ούρα, ενώ το υπόλοιπο στα κόπρανα (215).



Εικόνα 9.2.1: Οι χημικές δομές της μινοκυκλίνης (αριστερά) και της δοξυκυκλίνης (δεξιά). Αναρτημένο από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Η μινοκυκλίνη απορροφάται σχεδόν πλήρως (95-100%), κυρίως στο στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο και τη νήστιδα (214). Η κινητική της απορρόφηση ακολουθεί το ίδιο ευρύ πρότυπο όπως και για την τετρακυκλίνη, δηλαδή μετά από τη χορήγηση από το στόμα αύξηση της C_{max} στις 2 ώρες μετά την χορήγηση. Η πρόσδεση πρωτεϊνών είναι 76% και η απορρόφηση μειώνεται μετά από συγχορήγηση με σίδηρο ή αντιόξινα όπως ασβέστιο ή μαγνήσιο (216). Η μινοκυκλίνη σε αντίθεση με την δοξυκυκλίνη έχει ποικιλία μεταβολιτών. Έχουν περιγραφεί μέχρι έξι μεταβολίτες, μερικοί από τους οποίους έχουν αντιμικροβιακή δράση και μπορούν να εντοπιστούν στο ουροποιητικό σύστημα. Ο κύριος μεταβολίτης είναι η 9-υδροξυ-μινοκυκλίνη και οι άλλοι δύο κύριοι μεταβολίτες είναι μονο-N-απομεθυλιωμένα παράγωγα (216). Μικρό ποσοστό της (2-5%) επαναρροφάται στο ουροποιητικό και η νεφρική κάθαρση είναι περίπου 2,2-1,2 mL / min (217). Η μινοκυκλίνη φθάνει την C_{max} μετά από 2-3 ώρες έπειτα από στοματική δόση και παρουσιάζει μια παρατεταμένη ημιζωή στον ορό των 12-18 h (218). Η αποβολή του φαρμάκου επιτυγχάνεται κυρίως δια των νεφρών και των κοπράνων και υπόκειται σε ηπατικό μεταβολισμό (201).

Όπως αναφέρθηκε οι TCs είναι λιπόφιλες και αυτό επηρεάζει αρκετά την ιστική κατανομή με την μινοκυκλίνη να είναι σε θέση να διασχίσει τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ) πολύ πιο εύκολα σε σχέση με την δοξυκυκλίνη ή την τετρακυκλίνη. Πιο συγκεκριμένα η μινοκυκλίνη επιτυγχάνει σχεδόν τριπλάσια επίπεδα στον εγκέφαλο συγκριτικά με την δοξυκυκλίνη και την τετρακυκλίνη. Το γεγονός ότι διεισδύουν στο σμήγμα και εκκρίνονται στην εφίδρωση, τις έχει θέσει στο στόχαστρο επιστημονικών ερευνών για την θεραπευτική διαχείριση της ακμής, ιδιαίτερα στο στάδιο της φλεγμονής (219).

9.3 ΤΡΟΠΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Οδοί χορήγησης της μινουκυκλίνης αποτελούν: η στοματική, η ενδοφλέβια και η τοπική ενώ για την δοξυκυκλίνη ενδείκνυται η στοματική και η ενδοφλέβια οδός. Η δυνατότητα χρήσης είτε παρεντερικών είτε στοματικών σκευασμάτων παρέχει ευελιξία σε περιπτώσεις δυσανεξίας μιας εκ των δύο οδών. Όπως αναφέρθηκε η απορρόφηση από το στόμα λαμβάνει χώρα στο στομάχι και στο εγγύς τμήμα του λεπτού εντέρου και επηρεάζεται από την παρουσία τροφίμων, προϊόντων Ca^{++} και άλλων δισθενών κατιόντων. Γενικά οι μεγάλοι χρόνοι ημίσειας ζωής της δοξυκυκλίνης και της μινουκυκλίνης επιτρέπουν μικρή ημερήσια δοσολογία (1-2 φορές τη μέρα).

Η τάξη των τετρακυκλινών είναι γενικά ανεκτή, χωρίς πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι μικρές ανεπιθύμητες ενέργειες ποικίλουν, ενώ οι σοβαρές είναι αρκετά σπάνιες. Όσον αφορά την δοξυκυκλίνη, η οισοφαγική διάβρωση (220) και η φωτοευαισθησία (221) είναι οι πιο κοινές ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι υπόλοιπες ανεπιθύμητες ενέργειες της δοξυκυκλίνης κατά συστήματα, με βάση κλινικές δοκιμές και αναφορές περιστατικών αναφέρονται στον πίνακα (Πίνακας 9.3.1) παρακάτω (222).

Πίνακας 9.3.1: Ανεπιθύμητες Ενέργειες της δοξυκυκλίνης (100-200 mg καθημερινής δόσης per os)*	
Γαστρεντερικό Σύστημα	Οισοφαγική διάβρωση/έλκη Γαστρίτιδα Ναυτία/Εμετός
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	Ενδοκράνια υπέρταση Ληθαργικότητα
Αναπνευστικό Σύστημα	Ρινίτιδα
Ουρογεννητικό Σύστημα	Κολπίτιδα Κολπική κατιντίαση Κολπική ξηρότητα Αιδοιοκολπική φλεγμονή

Δερματικό Σύστημα (με ή χωρίς συμμετοχή άλλου συστήματος)	Φωτοευαισθησία Ονυχόλυση Κνησμός Αλλεργία Αντιδράσεις Υπερευαισθησίας Σύνδρομο Stevens-Johnson Σύνδρομο Sweet Εξανθήματα
Άλλα ανεπιθύμητα συμπτώματα	Υπογλυκαιμία Ανοσμία Θρομβοπενία Αιματολογικές Διαταραχές Αποχρωματισμός δοντιών Προσωρινή διαταραχή στην ανάπτυξη οστίτη οστού Πονοκέφαλος

*Με βάση κλινικές δοκιμές και αναφορές περιστατικών από τους Smith et al., Clin Ther. 2005.

Γενικά τα περιστατικά σοβαρών ανεπιθύμητων αντιδράσεων προκαλούμενων από τετρακυκλίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε οξείας και καθυστερημένης εμφάνισης, ανάλογα με τον χρόνο εκδήλωσης. Οι οξείες ανεπιθύμητες ενέργειες αφορούν συνήθως αντιδράσεις υπερευαισθησίας και δυσλειτουργίες μεμονωμένων οργάνων όπως του παγκρέατος και του ήπατος (223). Στις καθυστερημένες αντιδράσεις έχουν αναφερθεί περιστατικά Φαρμακευτικού Ερυθρηματώδους Λύκου, με τη χρήση κυρίως της μινocyκλίνης, παρά της δοξycυκλίνης (223).

Όσον αφορά την μινocyκλίνη, πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι κοινές με την δοξycυκλίνη αλλά υπάρχουν και άλλες όπως ο Φαρμακευτικός Ερυθρηματώδης λύκος, όπως αναφέρθηκε, η ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλες αυτοάνοσες διαταραχές που τη διαφοροποιούν από την δοξycυκλίνη (224, 225). Χαρακτηριστική είναι και η αυτοάνοση φαρμακευτική ηπατίτιδα που έχει αναφερθεί από την δράση της μινocyκλίνης (224, 226). Πάντως οι πιο συνηθισμένες

ανεπιθύμητες αντιδράσεις της μينوκυκλίνης αφορούν το ΚΝΣ και το γαστρεντερικό σύστημα. Στο ΚΝΣ είναι συχνά τα συμπτώματα ληθαργικότητας, ζάλης και vertigo, ενώ στο γαστρεντερικό σύστημα επικρατούν συμπτώματα ναυτίας, εμετού, διάρροιας, γαστρίτιδας και οισοφαγικών ελκών (227). Αυτή η δράση της μينوκυκλίνης στο ΚΝΣ συγκριτικά με την δοξυκυκλίνη, αφορά όπως αναφέρθηκε στην ικανότητά της να διασχίζει τον ΑΕΦ ευκολότερα. Εν κατακλείδι, οι ανεπιθύμητες ενέργειες των τετρακυκλινών δεν είναι ούτε λιγότερες, ούτε περισσότερες από οποιοδήποτε άλλη φαρμακευτική ουσία και σε κάθε περίπτωση ο ασθενής που βρίσκεται υπό αγωγή με αυτά τα σκευάσματα, πρέπει να παρακολουθείται τακτικά από τον θεράπων ιατρό του.

9.4 ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

Οι αντιβιοτικές ιδιότητες των τετρακυκλινών περιεγράφηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 40', αλλά στη συνέχεια τα φάρμακα αυτά απέκτησαν ενδιαφέρον όσον αφορά τις ιδιότητες τους εκτός της αντιμικροβιακής τους δράσης (211, 228, 229). Στην ενότητα αυτήν, το βιβλιογραφικό ενδιαφέρον εστιάζεται στην αντιφλεγμονώδη και ανοσοτροποποιητική δράση των τετρακυκλινών, ώστε να διερευνηθεί στη συνέχεια η δυνατότητα θεραπευτικής χρήσης τους στην ΣκΠ.

Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των τετρακυκλινών και ειδικά της δοξυκυκλίνης βρίσκουν εφαρμογή στην θεραπεία της ροδόχρου ακμής, η οποία είναι επιστημονικά τεκμηριωμένη ασθένεια φλεγμονώδους φύσεως (230). Οι βιοψίες δερματικών βλαβών σε ασθενείς με ροδόχρους ακμή δείχνουν αύξηση σε προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως TNF-α και IL-1β. Επίσης στην παθοφυσιολογία της νόσου συμμετέχουν και τα αντιδρώντα μόρια οξυγόνου (ROS) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Τα ROS είναι εξαιρετικά αντιδραστικά και περιλαμβάνουν υπεροξείδιο (O₂) - ελεύθερης ρίζας και ρίζα υδροξυλίου (OH), υπεροξείδιο υδρογόνου (H₂O₂), υποχλωριώδες (HOCl) και υπεροξείδιο (ONOO⁻). Ένας δακτύλιος φαινόλης πολλαπλών υποκαταστατών στα μόρια μينوκυκλίνης, δοξυκυκλίνης και τετρακυκλίνης φαίνεται να αιτιολογεί τις ικανότητες αυτών των ουσιών για απορρόφηση των ROS (231). Οι ευεργετικές επιδράσεις των τετρακυκλινών στην ροδόχρους ακμή πιθανώς συνδέονται με την ανασταλτική αυτή δράση τους στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, MMPs και ROS. Ακόμη, η μينوκυκλίνη και σε μικρότερο βαθμό η δοξυκυκλίνη μπορούν να αναστείλουν τόσο την παγκρεατική όσο και την μη παγκρεατική φωσφολιπάση A₂ (232), ένα ένζυμο με σαφή ρόλο στην φλεγμονή των αρθρώσεων και πιθανό ρόλο στην ροδόχρους ακμή. Στην εμφάνιση της φλεγμονής καθίσταται κρίσιμη και η μετανάστευση λευκών αιμοσφαιρίων. Οι τετρακυκλίνες δύναται να αναχαιτίσουν τη μετανάστευση ουδετερόφιλων, την προσκόλληση (233) και τέλος τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Επίσης οι τετρακυκλίνες έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν in vitro το σχηματισμό κοκκιώματος μονοπύρηνων κυττάρων αίματος (234), το οποίο είναι χαρακτηριστικό πολλών φλεγμονωδών παθήσεων. Μεταξύ των άλλων, η μينوκυκλίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση

κασπασών-1 και -3 (235), μιας εξελικτικά συντηρητικής τάξης κυτταροπλασματικών πρωτεασών που συμμετέχουν στην διαδικασία της απόπτωσης. Στην πολλαπλή δραστικότητα της συμβάλλει και η ικανότητά της να ενισχύει τα αποτελέσματα από τις bcl-2 πρωτεΐνες (236), μιας τάξης πρωτεϊνών που ελέγχει επίσης την απόπτωση μέσω διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Παράλληλα επιδρά στο μονοπάτι φωσφορυλίωσης του p38 MAPK (ενεργοποιημένες με μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες) αναστέλλοντάς το (237) και επηρεάζει αρνητικά την δραστηριότητα της πολυμεράσης της πολυ (ADP-ριβόζης) 1, PARP-1 (238).

Οι μέχρι τώρα γνωστοί μηχανισμοί αντιφλεγμονώδους δράσης των τετρακυκλινών και ειδικά της μινοκυκλίνης διαφαίνονται παρακάτω (**Σχεδιάγραμμα 9.4.1**).



Σχεδιάγραμμα 9.4.1: Μηχανισμοί που εμπλέκονται στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της μινοκυκλίνης.

Μετά από όλα τα παραπάνω, οι τετρακυκλίνες τέθηκαν στο ερευνητικό στόχαστρο πολλών μελετητών παγκόσμια και θεωρήθηκαν κάτι παραπάνω από αντιβιοτικά. Το 2009, οι Ishikawa et al. ανέφεραν ότι η μινοκυκλίνη (239) σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που λαμβάνονται θεραπευτικά (5-10 μM) μείωσε την μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα 2 παραγωγή IL-8 και συνεπώς εξασθένησε την φλεγμονώδη διεργασία σε επιδερμικά κερατινοκύτταρα. Παράλληλα, οι Macfarlane et al. και οι Stefansson et al, το 2005 και το 2008 αντίστοιχα, υπέθεσαν ότι η ικανότητα των τετρακυκλινών να δεσμεύονται σε δισθενή ιόντα όπως το Ca^{++} , επηρεάζοντας την ενδοκυττάρια σηματοδότηση και επιδρά στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος NF- $\text{K}\beta$ (240).

Βέβαια η αντιφλεγμονώδη δράση των τετρακυκλινών είναι αποτέλεσμα και της αντιμικροβιακής τους δράσης, διότι μειώνοντας το βακτηριακό φορτίο, μειώνουν παράλληλα και την δυνατότητα ανάπτυξης φλεγμονής από τα βακτηριακά προϊόντα.

Σημαντική αναφορά πρέπει να γίνει επίσης και στην συμμετοχή των τετρακυκλινών σε παθήσεις του ΚΝΣ. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, η υψηλή λιποδιαλυτότητα της μινουκυκλίνης, την καθιστά ικανή να διασχίζει εύκολα τον ΑΕΦ (214). Με βάση αυτό, αρκετές μελέτες εξέτασαν την δραστηριότητά της σε κύτταρα του εγκεφάλου και διαπίστωσαν ότι η μινουκυκλίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, η οποία έχει επιβλαβής δράση στην δημιουργία και την επιβίωση νευρώνων (235, 241-243). Πιθανό ρόλο στην αποτελεσματικότητά της σε νευροεκφυλιστικές και νευροφλεγμονώδεις διαταραχές διαδραματίζει η ικανότητά της να εξασθενεί την γονιδιακή έκφραση mRNA φλεγμονωδών παραγόντων όπως των IL-6 και IL-1β, του συμπλόκου μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC-II) και του toll-like υποδοχέα-2 (244). Η μινουκυκλίνη εξασθενεί την νευροφλεγμονή που προκαλείται από λιποσακχαρίτες (LPS), μειώνει την φλεγμονή του ιπποκάμπου και ελαττώνει την έκφραση mRNA της 2,3-διοξυγενάσης ινδολαμίνης (IDO), ενός ενζύμου που συμμετέχει δραστικά στο ανοσοποιητικό σύστημα (245). Έχει αναφερθεί επίσης ότι οι αντιφλεγμονώδεις ικανότητές της, δρούν προστατευτικά σε καταστάσεις ισχαιμίας εγκεφάλου, μειώνοντας το μέγεθος της ισχαιμικής περιοχής και αυξάνοντας την επιβίωση κυττάρων του ιπποκάμπου (246). Πιθανός προστατευτικός ρόλος σε άλλες νευρολογικές νόσους όπως στις Parkinson, Alzheimer και Huntington έχει επίσης προταθεί. Μέσω της αναστολής της έκφρασης κασπάσης-1 και κασπάσης-3, η μινουκυκλίνη μείωσε την επαγωγή της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), δρώντας προστατευτικά στην νόσο Huntington (247). Οι Du et al. το 2001 και οι Wu et al. το 2002, επισήμαναν την μείωση της ντοπαμινεργικής εκφύλισης που λαμβάνει χώρα στην νόσο Parkinson, από την μινουκυκλίνη εξαιτίας της δράσης της στην νευροτοξίνη MPTP (1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνης) και στην έκφραση της iNOS (248). Πρόσφατες μελέτες έχουν ερευνήσει αν το φαρμακολογικό προφίλ της μινουκυκλίνης έχει ενδιαφέρον στη θεραπεία της νόσου Alzheimer (249). Παρόλο που αποδείχθηκε ότι η μινουκυκλίνη βελτιώνει την γνωστική εξασθένηση και τα ελλείμματα στη μάθηση, που χαρακτηρίζουν τη νόσο του Alzheimer, αρκετή έρευνα πρέπει να διεξαχθεί ακόμα για να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα. Στην Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση, το φαρμακολογικό προφίλ της μινουκυκλίνης έδωσε επίσης αποτελέσματα, μέσω αναστολής του κυτοχρώματος c (250). Σε ζωικά μοντέλα ποντικίου, η μινουκυκλίνη καθυστέρησε την εκδήλωση εκφύλισης του κινητικού νευρώνα και την έκπτωση της μυϊκής ισχύος (251).

Τέλος, στο κύριο ερευνητικό μας ενδιαφέρον, πειραματικά στοιχεία και μελέτες υποδηλώνουν ότι οι τετρακυκλίνες (κυρίως η μινουκυκλίνη), μόνες τους ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα θα μπορούσαν να βελτιώσουν την εξέλιξη της ΣκΠ. Το 2002, δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες περιέγραψαν την ικανότητα της μινουκυκλίνης να εξασθενεί την κλινική και ιστολογική σοβαρότητα της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (252, 253). Οι Brundula et al. το 2002, έδειξαν ότι η μινουκυκλίνη μέσω της αναστολής της στην δραστηριότητα της MMP,

εξασθένησε την νευρωνική φλεγμονή, ακόμα και όταν χορηγήθηκε μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων. Στη συνέχεια, το 2007 οι Nikodemova et al., ανέφεραν ότι η θεραπεία με μινουκυκλίνη μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων μείωσε σημαντικά τη σοβαρότητα της πορείας της νόσου με παράλληλη μείωση του αριθμού και του μεγέθους των βλαβών (254). Το φαρμακολογικό όφελος της μινουκυκλίνης σχετίστηκε με την μειωμένη μετανάστευση μακροφάγων από την περιφέρεια στο ΚΝΣ, οδηγώντας σε μειωμένη μετανάστευση λευκοκυττάρων στο παρέγχυμα του νωτιαίου μυελού. Μάλιστα, αυτά τα νευροπροστατευτικά αποτελέσματα της μινουκυκλίνης βελτιώθηκαν όταν μεγάλες συγκεντρώσεις του φαρμάκου μεταφέρθηκαν τοπικά στο ΚΝΣ. Η μινουκυκλίνη αποδείχθηκε επίσης αποτελεσματική σε συνδυασμό με την ατορβαστατίνη (μία στατίνη που είχε αναφερθεί παλαιότερα ότι είναι κλινικά αποτελεσματική στην εξασθένηση της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας σε ζωικά μοντέλα ποντικού), με σημαντικότερη μείωση σοβαρότητας της νόσου και εξασθένηση της φλεγμονής συγκριτικά με την μεμονωμένη δράση των φαρμάκων (255). Επίσης το 2005 οι Guilianì et. al. παρουσίασαν ερευνητικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν την συνεργική δράση της μινουκυκλίνης με την οξική γλατιμέρη (256) και την IFN-β (257) σε πειραματικά μοντέλα της ΣκΠ.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η μινουκυκλίνη είναι αποτελεσματική στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, αφορά κυρίως την επίδρασή της στην δραστικότητα των T-κυττάρων και την ικανότητά της να αναστέλλει την μικρογλοιακή ενεργοποίηση. Παλαιότερες *in vitro* μελέτες αποκάλυψαν ότι η μινουκυκλίνη αναστέλλει την επεξεργασία αντιγόνου για παρουσίαση σε ανθρώπινα T-κύτταρα (258), τον πολλαπλασιασμό T-κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών μέσω ενός φραγμού φμπρονεκτίνης (259). *In vivo* μελέτες αναφέρουν ότι η μινουκυκλίνη προάγει την διαφοροποίηση από βοηθητικό T-κύτταρα τύπου 1 (Th1) σε βοηθητικά T-κυττάρων τύπου 2 (Th2), τροποποιώντας έτσι την ευαισθησία στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (253). Στην ίδια έρευνα, βρέθηκε ότι σε υποτροπιάζοντες με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα ποντικούς, στους οποίους είχε δοθεί μινουκυκλίνη, απουσίαζαν ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα. Η επιτυχία της μινουκυκλίνης σε πειραματικά μοντέλα ώθησε στην αξιολόγησή της σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους, οι οποίες θα αναλυθούν στην επόμενη ενότητα. Το 1996, οι Kloppeburg et. al. ισχυρίστηκαν ότι η μινουκυκλίνη επιδρά στην παραγωγή του TNF-α από τα T-λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα (260). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και για την δοξουκυκλίνη. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση στο mRNA του TNF-α και ότι η μινουκυκλίνη επιλεκτικά καταστέλλει την παραγωγή του TNF-α και της IFN-γ.

Η μινουκυκλίνη φάνηκε επίσης ότι επηρεάζει την μικρογλοία και προστατεύει από εκφυλισμό τον αμφιβληστροειδή, ρυθμίζοντας προς τα κάτω την έκφραση προφλεγμονωδών μορίων, όπως

των TNF- α , COX1 και COX2 (261). Παράλληλα επιδρά σε ενεργοποιημένα T-κύτταρα που σχετίζονται με τον Ανθρώπινο T λεμφοτρόπο ιός 1 (HTLV-1), ρυθμίζοντας την δραστηριότητα μονοπύρηνων μακροφάγων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη νόσο προκαλούμενη από τον ιό αυτό (262). Επίσης και η δοξυκυκλίνη και η μινोκυκλίνη φάνηκε να εξασθενούν τα αποτελέσματα από τις σπειροχέτες του *B. Burgdorferi*, τα οποία σχετίζονται με ισχυρές φλεγμονώδεις απαντήσεις στη νόσο του Lyme (263). Συγκεκριμένα σε διεγερμένα κύτταρα μονοκυτταρικής γραμμής THP-1 (κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων προερχόμενη από ασθενή με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία) και οι δύο τετρακυκλίνες ελάττωσαν την απελευθέρωση των TNF- α , IL-6, IL-8 και ρύθμισαν προς τα κάτω τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB (264). Σε μία άλλη *in vitro* μελέτη που έγινε σε παιδιατρικούς ασθενείς νοσούντες με αλλεργικό άσθμα από *Chlamydia pneumoniae*, η δοξυκυκλίνη σε δόση 0,1 mg/ML κατέστειλε την παραγωγή IFN- γ , ενώ δεν είχε σημαντική επίδραση στην παραγωγή *in vitro* IL-4 και σε IgE απαντήσεις (265).

Συμπερασματικά προκύπτει ότι η αντιφλεγμονώδης και η ανοσοτροποποιητική δράση των τετρακυκλινών είναι πολύπλευρη και άξια ενδιαφέροντος ως προς έρευνα και συζήτηση. Ας σημειωθεί ότι εκτός από τις δερματοπάθειες φλεγμονώδους αιτιολογίας και τις φλεγμονώδεις νόσους που αναφέρθηκαν στο κείμενο, οι τετρακυκλίνες έχουν δοκιμαστεί κλινικά και σε πολλές άλλες παθήσεις. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9.4.2) αναφέρονται κλινικές δοκιμές σε παθήσεις αυτοάνοσης και φλεγμονώδους αιτιολογίας για την δοξυκυκλίνη και την μινοκυκλίνη, ως συλλέχθηκαν από τον ιστότοπο: www.clinicaltrials.gov.

Πίνακας 9.4.2: Παθήσεις στις οποίες έχει ερευνηθεί σε κλινικές δοκιμές η δράση των τετρακυκλινών (δοξυκυκλίνης και μινοκυκλίνης).

	Παθήσεις φλεγμονώδους αιτιολογίας	Παθήσεις αυτοάνοσης αιτιολογίας
<u>Δοξυκυκλίνη</u>	Κοιλιακό Ανεύρυσμα Διαβητική Ρετινοπάθεια Οστεοαρθρίτιδα Διαβητικά Έλκη	

	Χρόνια Περιοριστική Πνευμονική Πάθηση (COPD)	
<u>Μينوκυκλίνη</u>	<p>Άσθμα</p> <p>Σύνδρομο Ξηρού Οφθαλμού</p> <p>Φλεγμονή των ούλων</p> <p>Ιδιοπαθής Πνευμονική ίνωση</p> <p>Ρευματοειδής Αρθρίτιδα</p> <p>Πνευμονοθώρακας</p> <p>Σκληρυντική Χολλαγειίτιδα</p>	<p>Αμυατροφική Πλευρική Σκλήρυνση</p> <p>Σκλήρυνση Κατά Πλάκας</p>

9.5 ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΚΠ

Από τις τετρακυκλίνες, η μινοκυκλίνη έχει δοκιμαστεί κλινικά σε ασθενείς με ΣκΠ. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται κλινικές δοκιμές της μινοκυκλίνης σε ασθενείς με ΣκΠ, ως συλλέχθηκαν από τον ιστότοπο: www.clinicaltrials.gov.

Πίνακας 9.5.1. Κλινικές μελέτες, στις οποίες έχει δοκιμαστεί η μινοκυκλίνη σε ασθενείς με ΣκΠ.

Τίτλος κλινικής μελέτης	Συνθήκες	Παρεμβάσεις	Κατάσταση
Minocycline as add-on to Interferon Beta-1a [IFN Beta-1a] (Rebif®) in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis [RRMS]	RRMS	<ul style="list-style-type: none">ΜινοκυκλίνηΕικονικό φάρμακο	Τερματίστηκε με αποτελέσματα
Safety and Efficacy Study of Copaxone Administered in Combination With Minocycline	RRMS	<ul style="list-style-type: none">Οξική γλατιμέρη με μινοκυκλίνηΟξική γλατιμέρη με εικονικό φάρμακο	Ολοκληρώθηκε
Minocycline in Clinically Isolated Syndromes (CIS)	CIS/Πρόωρη υποτροπή ΣκΠ	<ul style="list-style-type: none">ΜινοκυκλίνηΕικονικό φάρμακο	Ολοκληρώθηκε
Neuroprotection and Repair in Optic Neuritis	Σκπ/Οπτική νευρίτιδα	<ul style="list-style-type: none">Μινοκυκλίνη	Τερματίστηκε

Σε μια πρόσφατη τυχαιοποιημένη και ελεγχόμενη κλινική δοκιμή (266), η μινοκυκλίνη μείωσε σημαντικά την μετάπτωση ενός κλινικά απομονωμένου συνδρόμου σε ΣκΠ συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο. Από τον Ιανουάριο του 2009 έως τον Ιούλιο του 2013 συνολικά 142 συμμετέχοντες (ηλικίας μεταξύ 18 και 60 ετών) που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής στην κλινική δοκιμή χωρίστηκαν σε δυο ομάδες, η μία εκ των οποίων ελάμβανε καθημερινά 100 mg μινοκυκλίνης από του στόματος, δυο φορές τη μέρα, ενώ στην άλλη χορηγούνταν το εικονικό φάρμακο. Οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε εργαστηριακές και απεικονιστικές εξετάσεις και εκτιμήσεις κλιμάκωσης κινητικής δυσλειτουργίας και τα αποτελέσματα συναξιολογήθηκαν σε 2 χρονικά σημεία (στους 6 και 24 μήνες). Στην ομάδα που έλαβε μινοκυκλίνη παρατηρήθηκε ότι ο κίνδυνος μετατροπής από ένα κλινικά απομονωμένο σύνδρομο σε ΣκΠ σε 6 μήνες ήταν σημαντικά χαμηλότερος με τη μινοκυκλίνη συγκριτικά με το εικονικό φάρμακο τόσο στις μη διορθωμένες όσο και στις αναπροσαρμοσμένες αναλύσεις. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων στα αποτελέσματα δεν διατηρήθηκαν στο χρονικό σημείο των 24 μηνών και λόγω του περιορισμένου αριθμητικού δείγματος, οι συγγραφείς συστήνουν την επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων σε περαιτέρω δοκιμές.

10 ΣΚΟΠΟΣ

Ο πρωταρχικός σκοπός της μελέτης είναι ο προσδιορισμός της *in vitro* ανοσοτροποποιητικής επίδρασης των τετρακυκλινών σε κύτταρα ασθενών με ΣΚΠ υπό συμβατική αγωγή (IFNβ, Natalizumab, Copaxone και άλλων) και ασθενών χωρίς αγωγή (*naïve*):

α.) στα επίπεδα και τη λειτουργικότητα (παραγωγή IFN-γ και IL-17) προφλεγμονώδων κυτταρικών πληθυσμών (Th1, Th17, NK, NKT) που θα εκτιμηθεί από ποσοτικές και ποιοτικές μετρήσεις αυτών.

β.) στα επίπεδα και τη λειτουργικότητα (παραγωγή IL-10) ρυθμιστικών κυτταρικών πληθυσμών, που θα εκτιμηθεί από ποσοτικές και ποιοτικές μετρήσεις των Tregs και Bregs

Τελικός σκοπός είναι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας θεραπευτικής χρήσης των τετρακυκλινών στην ΣΚΠ, μέσω σύγκρισης των αποτελεσμάτων της δράσης των τετρακυκλινών σε ασθενείς με ΣΚΠ και υγιείς μάρτυρες.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

11 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

11.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σε χρονικό διάστημα 4 μηνών συλλέχθηκαν δείγματα αίματος ασθενών από την Νευρολογική Κλινική και από το εξωτερικό ιατρείο ΣκΠ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Οι ασθενείς, ποικίλου ηλικιακού εύρους ανήκουν σε διαφορετικούς τύπους ΣκΠ όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 11.1.** και κατά το διάστημα της αιμοληψίας βρίσκονταν υπό διαφορετικές αγωγές. Οι ασθενείς υπό διερεύνηση για ΣκΠ κατά το χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, εκείνους που εκδήλωσαν τελικά ΣκΠ και δεν έλαβαν κάποια αγωγή (naïve) και εκείνους που δεν εκδήλωσαν ΣκΠ και αποκλείστηκαν από την έρευνα. Παράλληλα συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από υγιείς δότες ως μάρτυρες (controls). Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τον σκοπό της έρευνας και υπέγραψαν υπεύθυνη συγκατάθεση παράλληλα με την παράθεση του ιατρικού και φαρμακευτικού τους ιστορικού. Παρακάτω φαίνονται τα κριτήρια επιλογής και αποκλεισμού συμμετεχόντων. Συνολικά συλλέχθηκαν δείγματα από 10 υγιείς δότες, 12 ασθενείς με RRMS υπό θεραπεία, 2 ασθενείς με SPMS χωρίς θεραπεία και 5 πρωτοδιαγνωσθέντες με ΣκΠ. Δύο από τους RRMS αποκλείστηκαν γιατί είχαν επιπλέον αυτοάνοσα νοσήματα, οπότε το τελικό δείγμα διαμορφώθηκε όπως στον **Πίνακα 11.1.1.** Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Παράλληλα συλλέχθηκαν δεδομένα για την φαρμακευτική αγωγή των ασθενών, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 11.1.2.**

Πίνακας 11.1.1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα.

Χαρακτηρισμός	Αριθμός (n)	Γυναίκες	Άντρες	Μέσος όρος ηλικίας (N)
Υγιείς	n=10	3	7	37
RRMS	n=10	6	4	31
SPMS	n=2	1	1	42
Naïve	n=5	4	1	32

Πίνακας 11.1.2 Φαρμακευτική αγωγή ασθενών με RRMS κατά το διάστημα της δειγματοληψίας.

	Οξική γλατιμέρη (Copaxone)	Ναταλιζουμάμπη (Tysabri)	IFN-β1
RRMS	2	2	6

Κριτήρια επιλογής ασθενών

- ΣκΠ προ και μετά θεραπείας

Κριτήρια αποκλεισμού ασθενών

- Πρόσφατη λήψη τετρακυκλινών
- Οποιαδήποτε λήψη θεραπείας για την ΣΚΠ για τους πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς
- Επιπλέον αυτοάνοσα νοσήματα και φαρμακευτική αγωγή για αυτά

Κριτήρια αποκλεισμού υγιών δοτών

- Πρόσφατη λήψη τετρακυκλινών

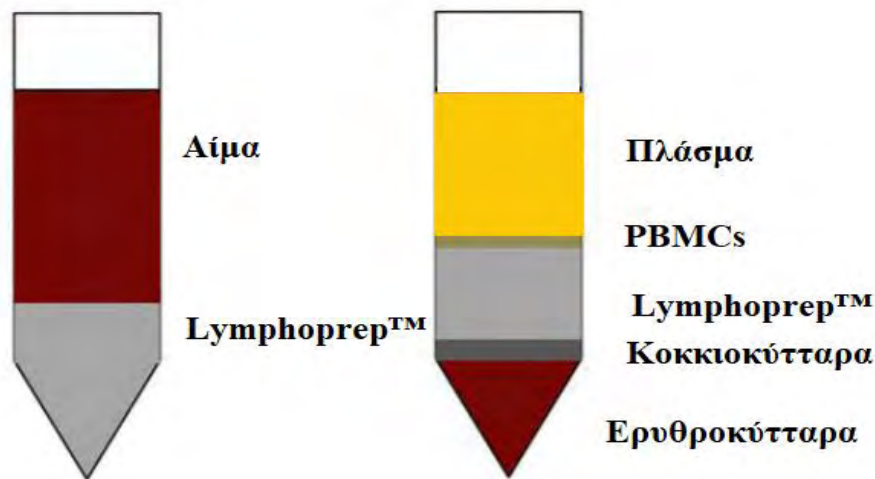
11.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBMCs)

Υλικά και αντιδραστήρια:

- Ηπαρινισμένη σύριγγα συλλογής αίματος (20 ml)
- 50 ml αποστειρωμένος δοκιμαστικός σωλήνας
- Μέσο RPMI1640 εμπλουτισμένο με γλουταμινικό οξύ
- Στείρες πιπέτες Pasteur
- Διάλυμα Lymphoprep™
- Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Υγρό άζωτο

Μέθοδος:

1. Συλλογή υπό άσηπτες συνθήκες 20ml περιφερικού αίματος με ηπαρινισμένη σύριγγα.
2. Καλή ανάμειξη της σύριγγας με αναστροφή 5-6 φορές και διατήρηση της σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο (εντός 12 ωρών).
3. Σημειώνονται οι πληροφορίες του ασθενούς, ως προς την αγωγή και το ιατρικό τους ιστορικό.
4. Απομόνωση λεμφοκυττάρων χρησιμοποιώντας διάλυμα διαβάθμισης πυκνότητας φικόλλης Lymphoprep™ (**Εικόνα 11.2.1**).
5. Τοποθέτηση σταδιακά 20ml αίματος σε 10ml Lymphoprep™ που εμπεριέχονται στον δοκιμαστικό σωλήνα των 50 ml.
6. Φυγοκέντρηση υπό διαβάθμιση φικόλλης σε 2000 στροφές για 20 λεπτά σε φυγόκεντρο χωρίς φρένο.



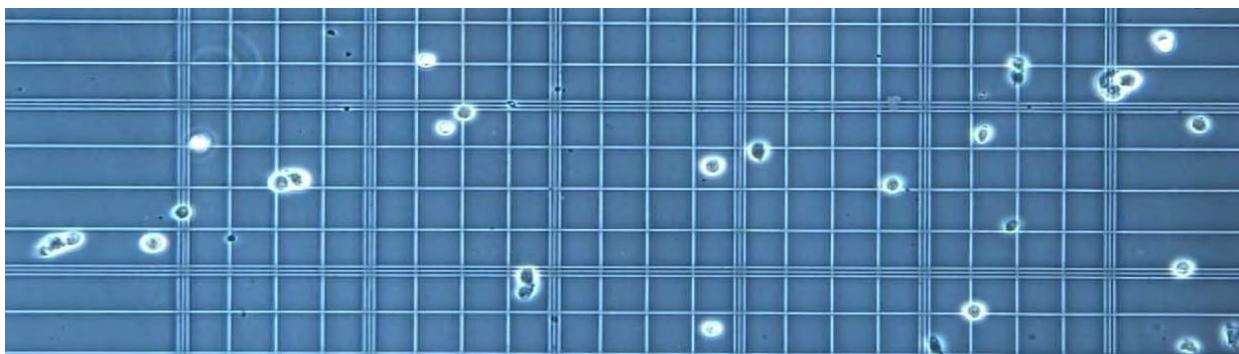
Εικόνα 11.2.1: Γραφική παράσταση στιβάδων αίματος υπό διαβάθμιση φικόλλης πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την φυγοκέντρωση. Μετά την φυγοκέντρωση προκύπτουν 3 στιβάδες, πάνω βρίσκεται το πλάσμα, ενδιάμεσα τα μονοκύτταρα και η κατώτερη περιλαμβάνει τα κοκκιοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα μαζί με την φικόλλη.

7. Συλλογή προσεκτικά του πλάσματος σε κατάλληλα επισημασμένο σωληνάριο falcon των 15 ml.
8. Προσεκτική συλλογή των λεμφοκυττάρων σε ξεχωριστό σωληνάριο falcon των 15 ml.
9. Στο τελευταίο σωληνάριο γίνεται προσθήκη μέσου RPMI1640, πλύση και φυγοκέντρωση σε 1800 στροφές για 5 λεπτά.
10. Με μεγάλη προσοχή ώστε να μην πειραχθεί το κυτταρικό ίζημα, γίνεται απόρριψη και πλύση και πάλι με νέο RPMI1640.
11. Επαναιώρηση σε 1 ml διαλύματος κρυοσυντήρησης που αποτελείται από 60-90% FCS / 10% DMSO.
12. Κατάψυξη των δειγμάτων στους -20°C , σε ειδικό CryoBox για τουλάχιστον 24 ώρες.
13. Μεταφορά σε υγρό άζωτο για μακροχρόνια αποθήκευση.
14. Απόψυξη του εναιωρήματος κατεψυγμένων λεμφοκυττάρων στους 37°C .
15. Πλύση με RPMI1640 και προσεκτική απόρριψη του υπερκειμένου διαλύματος κρυοσυντήρησης.
16. Τα κύτταρα είναι τώρα έτοιμα για μεταγενέστερη χρήση.

11.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ TRYPAN BLUE

Υλικά:

- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer
- 0.4% διάλυμα Trypan Blue
- Οπτικό μικροσκόπιο



Εικόνα 11.3.1: Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων με εστίαση στις γραμμές πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου και μεγέθυνση x10. Τα ζωντανά κύτταρα δεν βάφονται με Trypan Blue.

Μέθοδος

1. Γίνεται λήψη 100μl κυττάρων σε κωνικό σωληνάριο τύπου Eppendorf και προσθήκη 400μL 0.4% διαλύματος Trypan Blue (τελική συγκέντρωση 0.32%). Απαραίτητη κρίνεται η καλή ανάμειξη.
2. Γίνεται λήψη 100μl κυτταρικού εναιωρήματος που έχει υποστεί κατεργασία με Trypan Blue και στη συνέχεια εφαρμογή σε αιμοκυτταρόμετρο. Γίνεται πλήρωση των δύο θαλάμων κάτω από την καλύπτρα, επιτρέποντας την αφαίρεση των κυττάρων από την τριχοειδή δράση
3. Χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο, πραγματοποιείται εστίαση στις γραμμές πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου με μεγέθυνση 10X (**Εικόνα 11.3.1**).
4. Ακολουθεί μέτρηση των ζωντανών, μη χρωματισμένων κυττάρων (τα ζωντανά κύτταρα δεν βάφονται από Trypan Blue).
5. Πολλαπλασιασμός του αποτελέσματος X10000.
6. Πολλαπλασιασμός με 5 για να διορθωθεί η αραίωση 1:5 από την προσθήκη Trypan Blue.
7. Η τελική τιμή είναι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων/ml στο αρχικό κυτταρικό εναιώρημα.

Ο προσδιορισμός βιώσιμων κυττάρων κρίνεται αναγκαίος για την έκβαση των παρακάτω πειραμάτων και την χρήση καταλλήλων ποσοτήτων αντιδραστηρίων.

11.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ PBMCs

Υλικά και αντιδραστήρια:

- Θρεπτικό μέσο RPMI1640
- Ορός εμβρύου μόσχου (FCS)
- Πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 24 κελιών
- Complete medium (10% FCS σε RPMI1640)

Μέθοδος

1. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας 24 κελιών.

2. Προστίθενται τα αντιδραστήρια (πχ. αντιβιοτικά στην προσχεδιασμένη συγκέντρωση) για το εκάστοτε πρωτόκολλο.
3. Σε κάθε κελί προστίθεται $0,5 \times 10^6$ - 1×10^6 PBMCs ανα ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού RPMI1640.
4. Οι πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας τοποθετούνται σε επωαστήρα με συνθήκες 37°C και 5% CO_2 .
5. Τα κύτταρα επωάζονται για χρονικό διάστημα ανάλογα με το εκάστοτε πρωτόκολλο.

11.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

Τα 2 αντιβιοτικά της τάξης των τετρακυκλινών (μινοκυκλίνη και δοξυκυκλίνη), καθαρότητας $\geq 98\%$ παραγγέλθηκαν απο απο την εταιρία Cayman Chemical Company Michigan USA (Εικόνα 11.5.1).



Εικόνα 11.5.1: Τα φαρμακευτικά σκευάσματα της δοξυκυκλίνης και της μινοκυκλίνης που χρησιμοποιήθηκαν για σκοπούς της ερευνητικής της έρευνας.

Η προετοιμασία τους περιλάμβανε αρχικά επανασύσταση και αραιώση σε DMSO και στη συνέχεια αποθήκευση και διαχωρισμό σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) τελικής συγκεντρώσεως των 5mg/ml.

Ακολούθως, στα κελιά της πλάκας κυτταρικής καλλιέργειας που δεν προστέθηκαν αντιβιοτικά, τοποθετήθηκε DMSO σε συγκέντρωση περίπου 0,5%.

Με βάση τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (260, 267, 268) για τα ακόλουθα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι δόσεις των 50μg/ml και 20μg/ml για τα δύο αντιβιοτικά. Προκειμένου να προκύψουν αυτές οι συγκεντρώσεις από τις αποθηκευμένες μικροποσότητες αντιβιοτικών έγινε αραιώση 1/100 για την συγκέντρωση των 50μg/ml και 1/250 για την συγκέντρωση των 20 μg/ml.

Στο 1ml (1000μl) καλλιέργειας σε κάθε κελί της πλάκας καλλιέργειας προστέθηκε 10 μl και 4 μl αντιβιοτικών για τις δόσεις των 50μg/ml και 20μg/ml αντιστοίχως.

Οι μετατροπές των δόσεων σε από μg/ml σε Μμ δεδομένου ότι το Μοριακό Βάρος (MB) της μινοκυκλίνης είναι 457.47 g/mol και της δοξυκυκλίνης 444.43 g/mol έχουν ως εξής:

	Μινοκυκλίνη	Δοξυκυκλίνη
50 µg/ml	109.2 µM	112.5 µM
20 µg/ml	43.7 µM	45 µM

11.6 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Διέγερση της παραγωγής IFN-γ από T λεμφοκύτταρα

Ένα σημαντικό ένζυμο που συμμετέχει στην μετάδοση μηνύματος ενεργοποίησης T λεμφοκυττάρων είναι η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην λειτουργικότητα και τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων αυτών. Η παραγωγή της PKC μπορεί να διεγερθεί από την χημική ουσία phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (269). Ένας ακόμη παράγοντας που συμμετέχει επίσης στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, μέσω αύξησης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου είναι η ιονομυκίνη (IONO). Η συνδυαστική δράση αυτών των δύο παραγόντων σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων οδηγεί στην ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κυτταροκινών από τα T κύτταρα.

Ένα άλλο μονοπάτι μεταγωγής σήματος και ενεργοποίησης T κυττάρων μεσολαβείται μέσω των IL-12/IL-18. Φυσιολογικά μικροοργανισμοί και άλλα ερεθίσματα όπως ο CD14/Toll-like receptor (TLR) κινητοποιούν μακροφάγα και άλλα APCs να παράγουν IL-12, IL-23, IL-27, IL-18 και παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-α), οι οποίοι με τη σειρά τους διεγείρουν T και NK κύτταρα για παραγωγή IFN-γ (270). Η IL-18, μέλος της οικογένειας της IL-1 κυτταροκίνης, συμμετέχει σε πολλές αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις ασθένειες που προκαλούνται από Th1 κυτταρική απάντηση. Στις τύπου Th1 κυτταρικές απαντήσεις, οι IL-12/IL-18 προάγουν την παραγωγή IFN-γ και διεγείρουν την κυτταροτοξικότητα από NK και T κύτταρα (271). Στις έμφυτες ανοσολογικές αντιδράσεις, η παραγόμενη κυρίως από τα μακροφάγα IL-12 επάγει την παραγωγή IFN-γ και τη διαφοροποίηση των κυττάρων Th1. Συνεπώς, το μονοπάτι αυτό μεταγωγής σήματος παραγωγής IFN-γ, αποτελεί φυσιολογική οδό ανοσολογικών αποκρίσεων.

Προσδιορισμός ανοσορυθμιστικών πληθυσμών (Tregs, Bregs)

Τα B λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται με επιφανειακή χρώση ανοσοσυζευγμένων αντισωμάτων έναντι των CD19, CD24, CD38, και CD27 και προσμετρούνται τα ποσοστά naïve, memory B cells and transitional, memory Bregs (272). Τα ολιγονουκλεοτίδια (ODNs) CpG είναι συνθετικά ODNs που περιέχουν μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG σε συγκεκριμένα πλαίσια αλληλουχίας (μοτίβα CpG). Τα CpG ODNs δρουν μέσω του Toll-like receptor 9 (TLR9), οδηγώντας σε ισχυρά ανοσοδιεγερτικά αποτελέσματα (273). Τα ολικά PBMC καλλιεργούνται χωρίς ή με την παρουσία ειδικών ή μη διεγερτών όπως polyclonal IgM (BCR activation) bacterial CpG (ODN2006 – TLR-9 activation), bacterial LPS (TLR-4 activation, PMA, ιονομυκίνης κ.ά. με στόχο την

ενεργοποίηση και διαμορφοποίηση των B κυττάρων στην παραγωγή IL-10 (Bregs). Τα B κύτταρα και τα πλασματοκυτταρικά δενδριτικά κύτταρα (pDCs) είναι οι κύριοι κυτταρικοί τύποι σε ανθρώπους που εκφράζουν TLR-9 και ανταποκρίνονται σε CpG διεγέρτες. Το ODN 2006 είναι CpG ODN τύπου B ειδικό για την ενεργοποίηση του ανθρώπινου TLR9 (274). Η μεταγωγή σήματος TLR προκαλεί έκκριση IL-10. Ο συνδέτης CD40 (CD40L) είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια TNF. Εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα CD4+ T κύτταρα, καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων. Ο CD40L προσδένεται με το CD40, που εκφράζεται σε B λεμφοκύτταρα και APCs και αυτή η δέσμευση μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών (275). Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPSs), συστατικά κυτταρικού τοιχώματος Gram (-) βακτηρίων ενεργοποιούν κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος μέσω του TLR4, μέλους της οικογένειας πρωτεϊνικών υποδοχέων τύπου Toll, που αναγνωρίζει κοινά μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (pathogen-associated molecular-patterns PAMPs) (276). Η μακροκυκλική λακτόνη Brefeldin είναι ένα παράγωγο μηκύτων (από το *Eupenicillium brefeldianum*) που αναστέλλει αναστρέψιμα την κυκλοφορία μεταξύ του ΕΔ και του συστήματος Golgi (277). Συγκεκριμένα εμποδίζει τη δέσμευση της κυτοσολικής πρωτεΐνης περιβλήματος και του παράγοντα ριβοζυλίνωσης ADP (ARF) στις μεμβράνες Golgi ενώ παράλληλα αναστέλλει την ανταλλαγή μεταξύ GDP και GTP. Επίσης επηρεάζει και άλλες κυτταρικές οδούς όπως την λυσοσωματική και τη στόχευση πολωμένων κυττάρων. Η χρήση του Brefeldin A είναι απαραίτητη για την ανίχνευση επιπέδων των παραγόμενων κυτταροκινών μετά από διέγερση, καθώς απουσία του οι κυτταροκίνες θα διέφευγαν από το κύτταρο και δε θα μπορούσαν κατ' επέκταση να ανιχνευθούν με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (278). Για τον χαρακτηρισμό Tregs κυττάρων γίνεται χρώση των T λεμφοκυττάρων με ανοσοσυζευγμένα αντισώματα έναντι των CD4/CD25 και του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3 (279).

11.7 ΕΠΩΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Υλικά και αντιδραστήρια:

- Διάλυμα χρώσης (Staining buffer)
- Μονιμοποιητικό μέσο 2% PFA (παραφορμαλδεΰδη)
- Διάλυμα διαπερατότητας (Permeabilization buffer/ Wash Buffer I)
- Μονοκλωνικά αντισώματα σεσημασμένα με φθοριοχρώματα
- Ηπαρινισμένες σύριγγες συλλογής αίματος
- Δοσίμετρα εμβόλου (πιπέτες) διαφόρων μεγεθών

Μέθοδος

1. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε κωνικά σωληνάρια τύπου Eppendorf και υπόκεινται σε φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά.

2. Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο και γίνεται πλύση με 800μl staining buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και έπειτα αφαίρεση του υπερκειμένου).
3. Προστίθεται τα επιφανειακά αντισώματα σε κατάλληλες ποσότητες, 100μl Staining Buffer και αναδεύονται.
4. Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C.
5. Πλύση με 800μl Staining Buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
6. Προσθήκη 200μl 2% PFA και ανάδευση.
7. Επώαση για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Πλύση με 800μl Staining Buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 2 λεπτά και προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου).
9. Επαναιώρηση σε 200μl Staining Buffer.
10. Τα κύτταρα παραμένουν στο ψυγείο για κάποιες ώρες (overnight), καθώς το πείραμα συνεχίζεται την επόμενη μέρα.
11. Πλύση με 800μl Staining Buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
12. Προσθήκη 200μl permeabilization buffer και ανάδευση με χρήση vortex.
13. Επώαση για 15 λεπτά στους 4°C.
14. Πλύση με 300μl permeabilization buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
15. Γίνεται προσθήκη των επιφανειακών αντισωμάτων σε κατάλληλες ποσότητες, 100μl permeabilization buffer και αναδεύονται.
16. Επώαση για 30 λεπτά στους 4°C.
17. Πλύση με 400μl permeabilization buffer (επαναιώρηση του δείγματος, φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 2 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου).
18. Προσθήκη Staining Buffer ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 200-250μl και προσεκτική ανάδευση.
19. Το δείγμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο και η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ξεκινήσει.

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 11.7.1**) αναγράφονται τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και την φαινοτύπηση κυττάρων από τους ασθενείς και τους υγιείς δότες. Όλα τα συζευγμένα αντισώματα φθοριοχρωμάτων για την ανάλυση κυτταρομετρίας ροής προμηθεύτηκαν από την BD Bioscience (San Jose, CA), BioLegend (San Diego, CA), και την Beckman Coulter (San Diego, CA).

Πίνακας 11.7.1. Τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την φαινοτύπηση κυττάρων.

Κυτταρικοί πληθυσμοί- Κυτταροκίνες	Μονοκλωνικά αντισώματα	Κλώνος	Ποσότητα (μl)
CD3+CD4+ T-κύτταρα	FITC Anti-Human CD3	UCHT1	5
	PE Anti-Human CD4	A161A1	2
CD3+CD8+ T-κύτταρα	FITC Anti-Human CD3	UCHT1	5
	PE Anti-Human CD8	SK1	2
CD3+ T-κύτταρα	FITC Anti-Human CD3	UCHT1	5
NK κύτταρα	PE-Cy5 Anti-Human CD56	B159	5
NKT κύτταρα	PE-Cy5 Anti-Human CD56	B159	5
	FITC Anti-Human CD3	UCHT1	5
B-κύτταρα	PE Anti-Human CD19	HIB19	5
CD4+CD25++FoxP3	FITC Anti-Human FoxP3	206D	5
	PE Anti-Human CD25	BC96	2
	APC Anti-Human CD4	RPA-T4	2
IFN-γ	APC Anti-Human IFN-γ	4S.B3	1

IL-17	PE Anti-Human IL-17B	SCPL1362	5
IL-10	APC Anti-Human IL-10	JES3-19F1	1
p38 MAPK	Alexa Fluor 647 Anti-Human p38 MAPK	36/p38	5

11.8 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

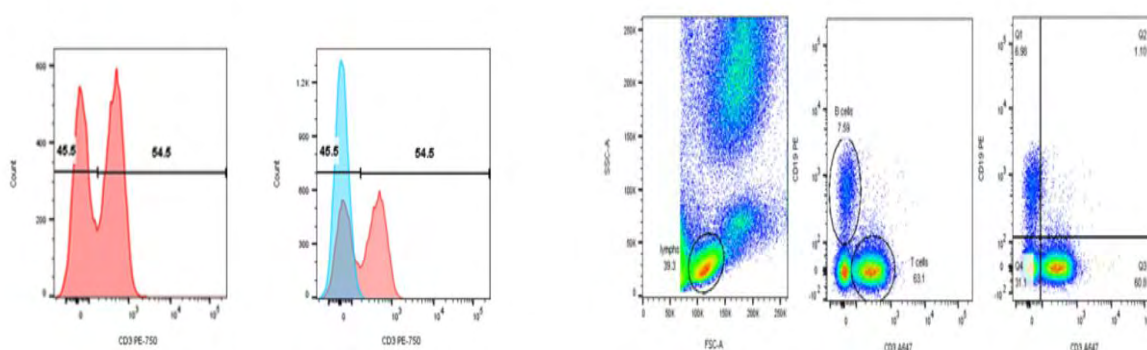
Η κυτταρομετρία ροής, αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο, για την ανάλυση των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων καθώς και για την ποσοτικοποίηση και τον διαχωρισμό μικρών σωματιδίων, όπως τα κύτταρα, όταν αυτά βρίσκονται σε εναιώρημα συνεχιζόμενης ροής (280). Τα μικροσωμάτια που βρίσκονται στο εναιώρημα κινούνται με σταθερή ταχύτητα σε ένα ρεύμα και περνούν μέσα από μία συσκευή οπτικών και ηλεκτρικών σημάτων. Η ανάλυση των δειγμάτων επιτυγχάνεται μέσω του σκεδασμού του φωτός σε συνδυασμό με τον φθορισμό που οφείλεται στην σήμανση των μικροσωματίων με φθορίζουσες ουσίες (280). Τα κυτταρόμετρα διαθέτουν πολλαπλά λέιζερ και ανιχνευτές φθορισμού, ώστε να είναι δυνατή η ακριβής ταυτοποίηση του εκάστοτε στόχου-πληθυσμού. Η πρόπτωση της δέσμης λέιζερ πάνω στα κύτταρα προκαλεί το φαινόμενο του σκεδασμού φωτός (σκεδασμός κατά Rayleigh–Debye–Gans). Ως φωτοανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτοδιόδοι που μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρικούς παλμούς και ανάλογα με το ηλεκτρικό ρεύμα μπορεί να τροποποιηθεί η ευαισθησία τους και να ενισχυθεί το σήμα. Τα βασικά συστήματα ενός κυτταρομέτρου είναι:

- Το σύστημα ροής υγρών (υδροδυναμικό σύστημα)
- Το οπτικό σύστημα
- Το ηλεκτρονικό (υπολογιστικό) σύστημα

Στην παρούσα μελέτη για την κυτταρομετρική ανάλυση των δειγμάτων εφαρμόστηκε τετραπλός άμεσος ανοσοφθορισμός. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τα λογισμικά Guava InCyte και FlowJo, LLC και ο κυτταρομετρή ροής που χρησιμοποιήθηκε είναι ο Guava easyCyte™ της Millipore. Σε κάθε ανάλυση, η εγκυρότητα της λειτουργικότητας ελεγχόταν με το guava easyCheck™ Kit. Ο λεμφοκυτταρικός πληθυσμός επιλέχθηκε βάση αρχικά βάσει των παραμέτρων πρόσθιου (forward-scattered light/FSC) και πλάγιου (side-scattered light/SSC) σκεδασμού για τον αποκλεισμό των ουδετερόφιλων, μονοκύτταρων, αιμοπεταλίων και συσσωμάτων ερυθρών (debris). Προκειμένου να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις στον κυτταρομετρή

ροής πρέπει η λεμφοκυτταρική καθαρότητα (lymphocyte purity), δηλαδή το ποσοστό των κυττάρων στο επιλεγμένο gate για τα λεμφοκύτταρα να είναι $\geq 90\%$. Επίσης η περιεκτικότητα σε λεμφοκύτταρα (lymphocyte recovery), δηλαδή το ποσοστό των λεμφοκυττάρων του δείγματος μέσα στο gate να είναι $\geq 95\%$. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων, όσον αφορά τους δείκτες επιφανείας χρησιμοποιούνται το ποσοστό (%) θετικών κυττάρων, δηλαδή το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν συγκεκριμένο επιφανειακό δείκτη και όσον αφορά τους δείκτες ενεργοποίησης χρησιμοποιείται η Μέση Ένταση Φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity/MFI).

Ο πιο συνήθης τρόπος απεικόνισης των αποτελεσμάτων είναι τα στικτογράμματα (dot plots) ή κυτταροδιαγράμματα (Εικόνα 11.8.2) και τα περιμετρικά διαγράμματα (contour plots) ή νεφελοδιαγράμματα.



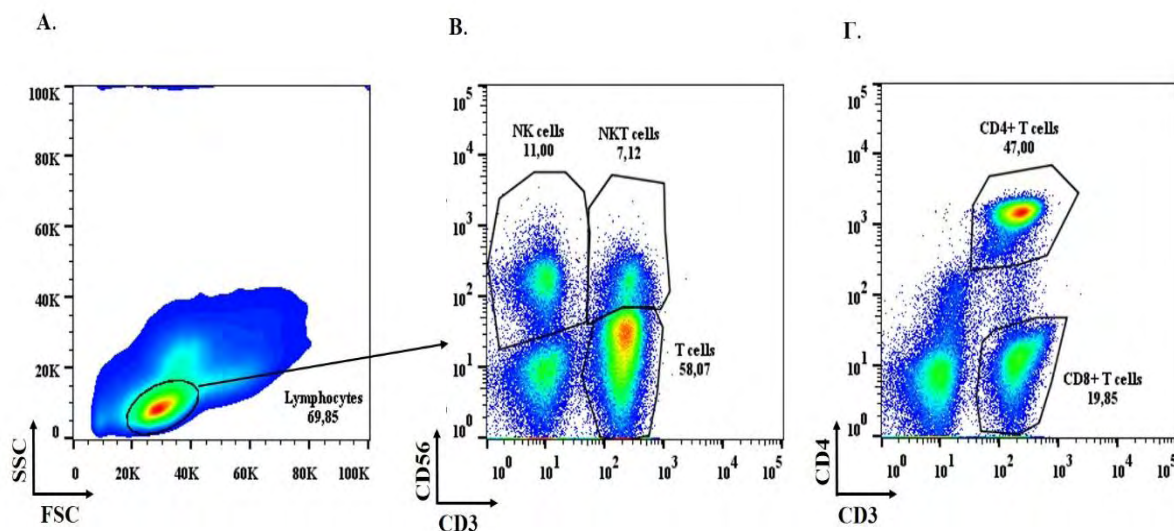
Εικόνα 11.8.2: Αριστερά: Κύτταρα εντός της πύλης των λεμφοκυττάρων (αριστερά) αντιπροσωπεύονται σε ένα ιστόγραμμα για να αξιολογηθεί η έκφραση ενός δείκτη. Δεξιά στην ίδια εικόνα φαίνεται η επικάλυψη αρνητικού πληθυσμού. Δεξιά: Κυτταροδιάγραμμα δύο παραμέτρων (dual color fluorescence), στο οποίο προσδιορίστηκαν τα ποσοστά B και T λεμφοκυττάρων. Προσαρμοσμένο από <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-gating-strategies.html>.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, τα ποσοστά των κυττάρων που εκφράζουν δείκτες κυτταρικής επιφάνειας και MFI περιεγράφηκαν ως μέσοι όροι ή μέσες τιμές από κάθε άτομο ξεχωριστά σε κάθε ομάδα. Η διακύμανση σε κάθε ομάδα ασθενών ορίστηκε μέσω σταθερής απόκλισης (Standard Deviation, SD) και το σφάλμα ορίστηκε μέσω της σταθερής απόκλισης λάθους (Standard Error of the Mean, SEM). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ασθενών και των υγιών ατόμων υπολογίστηκαν με την μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης ANOVA και με το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney. Οι τιμές P μικρότερες ή ίσες με 0,05 θεωρήθηκαν σημαντικές. Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με GraphPad Prism 7. Λογισμικό.

12 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Φαινοτυπικός προσδιορισμός λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με κυτταρομετρία ροής.

Μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με ΣκΠ, επωάστηκαν παρουσία ειδικών συζευγμένων με φθοριοχρώματα μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των φαινοτυπικών επιτόπων CD3, CD4, CD8 και CD56. Έπειτα από την επώαση, τα υπό επεξεργασία κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Ακολούθησε φαινοτυπικός προσδιορισμός των CD3+CD4+ T βοηθητικών λευκοκυττάρων, των CD3+CD8+ T κυτταροτοξικών λευκοκυττάρων, των CD56+CD3- φυσικών φονέων (NK) και των CD56+CD3+ NKT λευκοκυττάρων (**Εικόνα 12.1**).

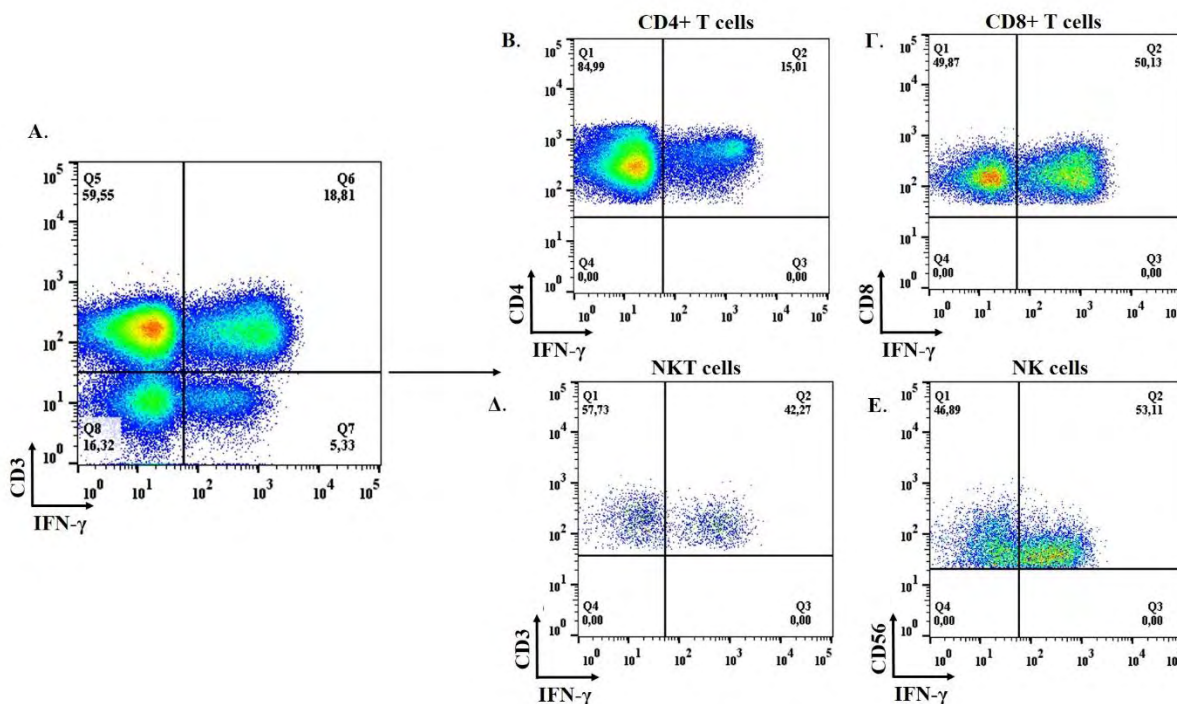


Εικόνα 12.1: Αντιπροσωπευτική φαινοτυπική ανάλυση και υπο-ταξινόμηση (sub-gating) κυτταρικών πληθυσμών περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων. (Α) Επιλογή των βιώσιμων λεμφοκυττάρων. (Β) Φαινοτυπική ανάλυση για τον χαρακτηρισμό NK και NKT κυττάρων. (Γ) Φαινοτυπική ανάλυση για τον χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση CD4+ και CD8+ κυττάρων.

Με βάση την πρόσθια και πλάγια σκέδαση φωτός (Forward Scatter and Side Scatter) έγινε επιλογή των βιώσιμων λεμφοκυττάρων (Lymphocyte gate) τα οποία εν συνεχεία αναλύθηκαν ως προς τους φαινοτυπικούς επιτόπους CD56/CD3 χαρακτηρίζοντας τα NK και NKT λεμφοκύτταρα όπως επίσης και ως προς τους φαινοτυπικούς επιτόπους CD4/CD3 χαρακτηρίζοντας τα CD4+ T και CD8+ T λεμφοκύτταρα. Ειδικότερα τα CD8+ T λεμφοκύτταρα ταυτοποιήθηκαν και ως CD4+ αρνητικά όπως φαίνεται (**Εικόνα 12.1**) αλλά και ως CD8+ θετικά με την χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του CD8.

Προσδιορισμός παραγωγής Ιντερφερόνης γάμμα (IFN- γ) από λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη.

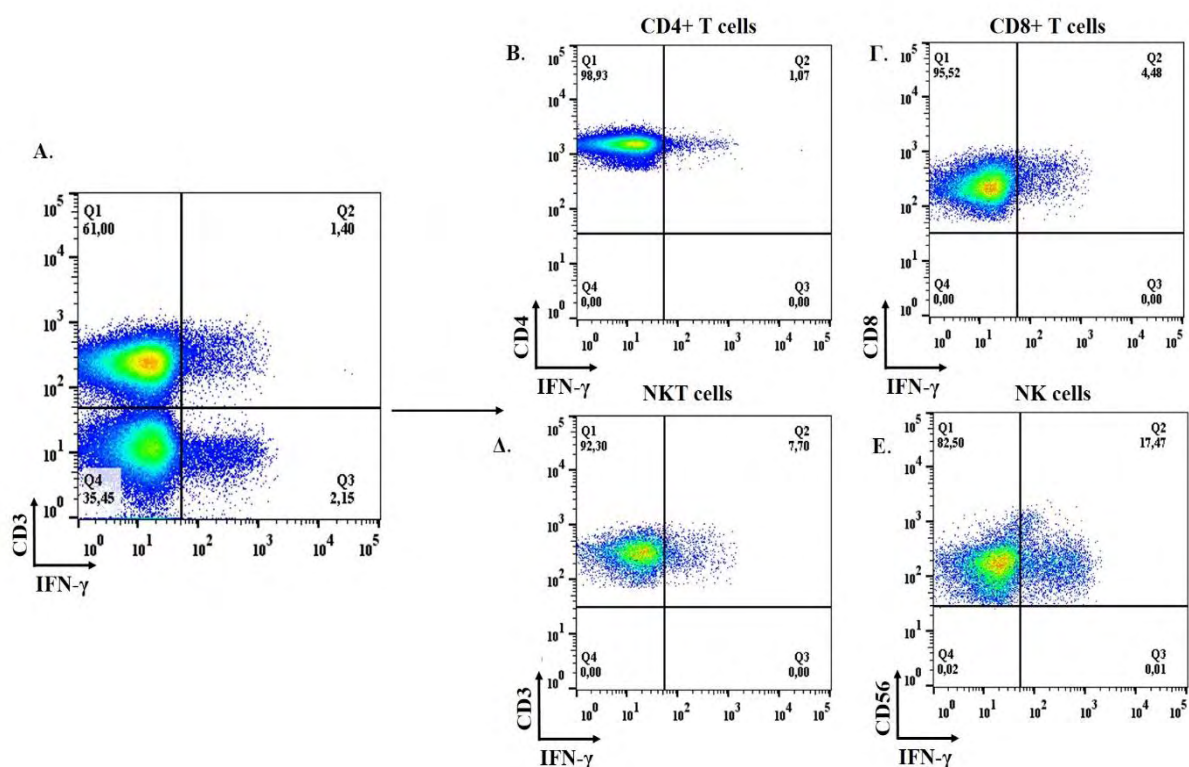
Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με ΣκΠ, ενεργοποιήθηκαν με τον συνδυασμό PMA και Ιονομυκίνης για διάστημα 5 ωρών. Ο συγκεκριμένος φαρμακευτικός τρόπος διέγερσης επιλέχθηκε διότι είναι ευρέως διαδεδομένος από την βιβλιογραφία ως ένας δυνατός, μη ειδικός τρόπος διέγερσης που οδηγεί στην γρήγορη παραγωγή κυτταροκινών (**Κεφάλαιο 11.6**) και επίσης αποτέλεσε έναν από τους τυπικούς τρόπους διέγερσης κυττάρων σε *in vitro* καλλιέργειες υπό την επίδραση TCs (260). Παράλληλα με την διέγερση μέσω PMA και Ιονομυκίνης, τα κύτταρα επωάστηκαν με τον φαρμακευτικό αναστολέα του στοιχείου Golgi Brefeldin A ώστε να δεσμευτούν οι παραγόμενες κυτταροκίνες εντός του κάθε κυττάρου. Στη συνέχεια έγινε διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης και επώαση με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της IFN- γ συζευγμένο με ειδικό φθοριόχρωμα (**Εικόνα 12.2**).



Εικόνα 12.2: Ενδεικτική ενδοκυττάρια χρώση IFN- γ όπως αυτή παράγεται από τους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς CD4+ T, CD8+ T, NK και NKT περιφερικού αίματος έπειτα από ενεργοποίηση με PMA και ιονομυκίνη. (A) χρώση CD3/IFN γ σε ολικά λεμφοκύτταρα όπου παρατηρείται η συνολική παραγωγή IFN- γ από τα CD3+ και CD3- λεμφοκύτταρα. (B-E) Η συνολική παραγωγή IFN- γ όπως εκφράζεται ξεχωριστά για κάθε λευκοκυτταρικό πληθυσμό (CD4+, CD8+, NK, NKT). Στις γωνίες των τεταρτημορίων παρουσιάζεται ο ποσοστιαίος αριθμός των θετικών κυττάρων είτε ως προς τους επιφανειακούς υποδοχείς είτε ως προς την ανίχνευση παραγωγής IFN- γ .

Προσδιορισμός παραγωγής IFN-γ από λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς έπειτα από διέγερση με Ιντερλευκίνη 12 και 18.

Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με ΣκΠ, ενεργοποιήθηκαν επίσης με τον συνδυασμό IL-12 και IL-18 για διάστημα 5 ωρών. Ο συγκεκριμένος μη φαρμακευτικός τρόπος διέγερσης επιλέχθηκε βάση των ακόλουθων παραμέτρων. Αρχικά αποτελεί έναν φυσιολογικό και ειδικό τρόπο διέγερσης από ότι η ενεργοποίηση μέσω PMA και Ιονομυκίνης (**Κεφάλαιο 11.6**) και οι IL-12+IL-18 δεσμεύονται από τους ανάλογους υποδοχείς IL-12R και IL-18R οι οποίοι εκφράζονται ενδογενώς στην επιφάνεια των NK και NKT κυττάρων ή έπειτα από ενεργοποίηση όπως σε περιπτώσεις φλεγμονής στην επιφάνεια των CD8⁺ T και CD4⁺ T λεμφοκυττάρων της επίκτητης ανοσίας (267). Οι IL-12+IL-18 δρουν συνεργατικά στην ενεργοποίηση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών από την διέγερση με PMA και ιονομυκίνη και ειδικότερα στοχεύοντας στον εναλλακτικό τρόπο (alternative pathway) ή (cytokine-induced pathway) επαγόμενο από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ο οποίος οδηγεί στην παράπλευρη (bystander) παραγωγή κυτταροκινών δίχως να εμπλέκει σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα TCR. Ως εκ τούτου αποτελεί έναν τρόπο ενεργοποίησης που μιμείται την μικροβιακή ή και ιογενή απειλή όπου τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα παράγουν IL-12 και IL-18 με πρωταρχικό σκοπό την ενεργοποίηση των NK και NKT κυττάρων της εγγενούς ανοσίας και την άμεση παραγωγή της IFN-γ (**Εικόνα 12.3**). Αυτός ακριβώς ο μηχανισμός δράσης αποτελεί και τον τέταρτο και πιο σημαντικό λόγο επιλογής του καθώς αρκετές μελέτες που πραγματοποιούνται την δράση τετρακυκλινών χρησιμοποίησαν είτε βακτηριακούς είτε ιογενείς τρόπους διέγερσης των κυττάρων (267).



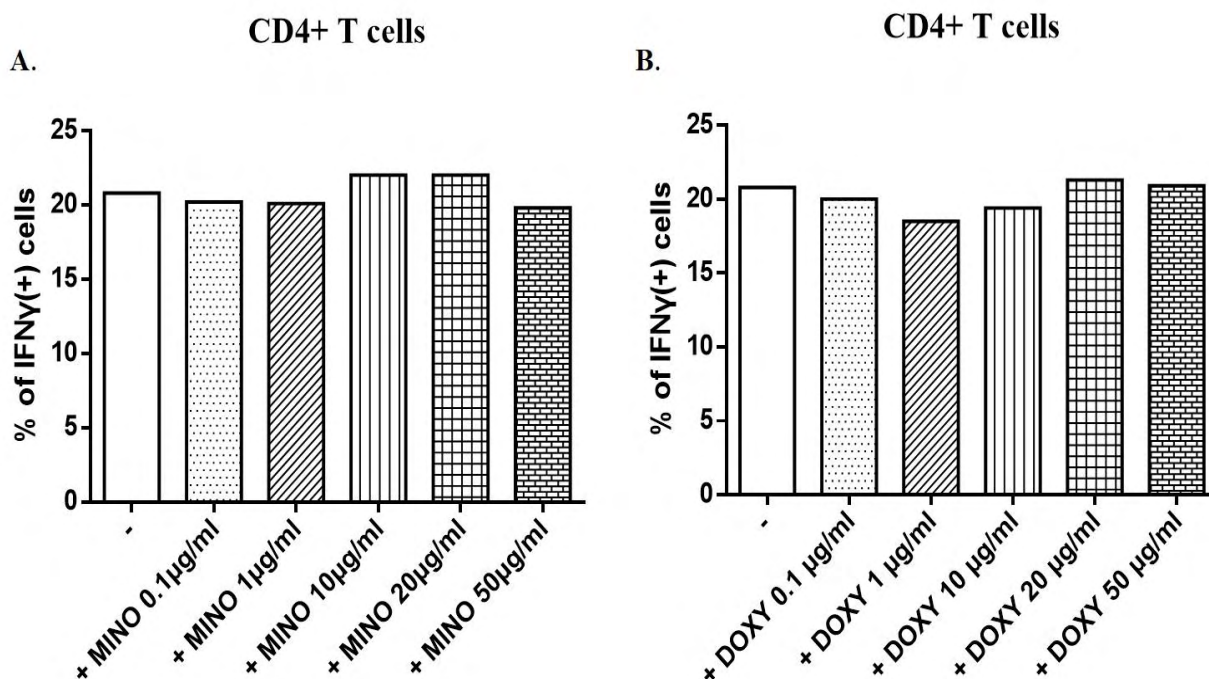
Εικόνα 12.3: Ενδεικτική ενδοκυττάρια χρώση IFN- γ όπως αυτή παράγεται από τους λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς CD4+ T, CD8+ T, NK και NKT περιφερικού αίματος έπειτα από ενεργοποίηση με IL-12+IL-18. (A) Χρώση CD3/IFN γ σε ολικά λεμφοκύτταρα όπου παρατηρείται η συνολική παραγωγή IFN- γ από τα CD3+ και CD3- λεμφοκύτταρα. (B-E) Παραγωγή IFN- γ όπως εκφράζεται ακριβώς από κάθε ομαδοποιημένο λευκοκυττάρικο πληθυσμό (CD4+, CD8+, NK, NKT).

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) μινουκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα CD4+ T έπειτα από διέγερση με PMA/Ιονομυκίνη και IL-12/IL-18.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η δοσολογία τετρακυκλινών σε *in vitro* αλλά και *in vivo* πειράματα κυμαίνεται συνήθως από 0.1-50 μ g/ml (260, 267) με την φαρμακευτική δόση σύμφωνα και με τις κλινικές μελέτες να βρίσκεται εντός του εύρους των 10-50 μ g/ml. Ως εκ τούτου, αρχικά διενεργήθηκε πείραμα με διαδοχικές συγκεντρώσεις τετρακυκλινών εντός του εύρους προτεινόμενου από την βιβλιογραφία, ώστε να διαπιστωθεί η βέλτιστη δόση του κάθε αντιβιοτικού ως προς την επίδραση στην παραγωγή IFN- γ από τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς. Έτσι παρακάτω παρουσιάζονται γραφήματα της επίδρασης διαφορετικής δοσολογίας τετρακυκλινών σε PBMCs ενός ενδεικτικού υγιή μάρτυρα διεγερμένα με PMA/Ιονομυκίνη όπως επίσης και με IL-12+IL-18. Οι τετρακυκλίνες προστέθηκαν στην κυτταροκαλλιέργεια αμέσως μετά την ενεργοποίηση των PBMCs και διατηρήθηκαν σε όλη την διάρκεια της διέγερσης (5 ώρες).

Αρχικά όσον αφορά τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.4** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη δεν υπήρξε μεταβολή της παραγωγής IFN-γ σε καμία δόση τόσο της μινοκυκλίνης όσο και της δοξυκυκλίνης.

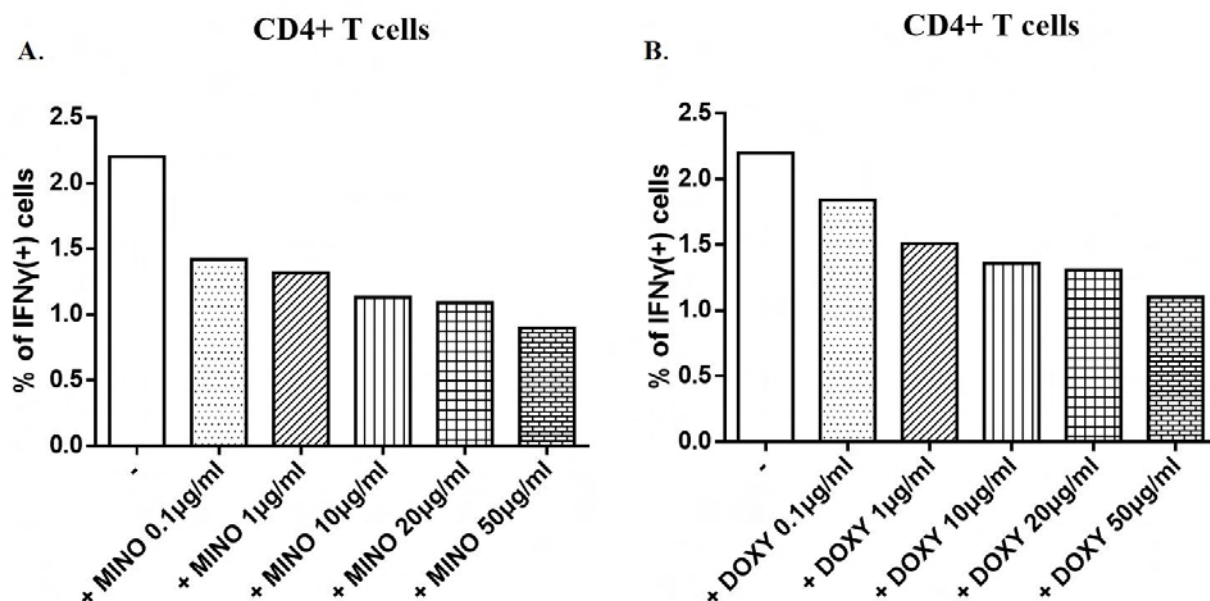
ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+IONOMYKINH



Εικόνα 12.4: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων (Α) μινοκυκλίνης και (Β) δοξυκυκλίνης σε CD4⁺ T λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη. Δεν υπάρχει καμία μεταβολή στην παραγωγή της IFN-γ και για τις δυο τετρακυκλίνες σε καμία δόση.

Αντίθετα, όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.5** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της παραγωγής IFN-γ παρουσία μινοκυκλίνης ή δοξυκυκλίνης. Ειδικότερα, η ελάττωση των IFN⁺ CD4⁺ T λεμφοκυττάρων κυμάνθηκε:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης από 35% στην δόση 0.1 μg/ml έως 60% στην δόση 50 μg/ml.
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης από 19% στην δόση 0.1 μg/ml έως 50% στην δόση 50 μg/ml.



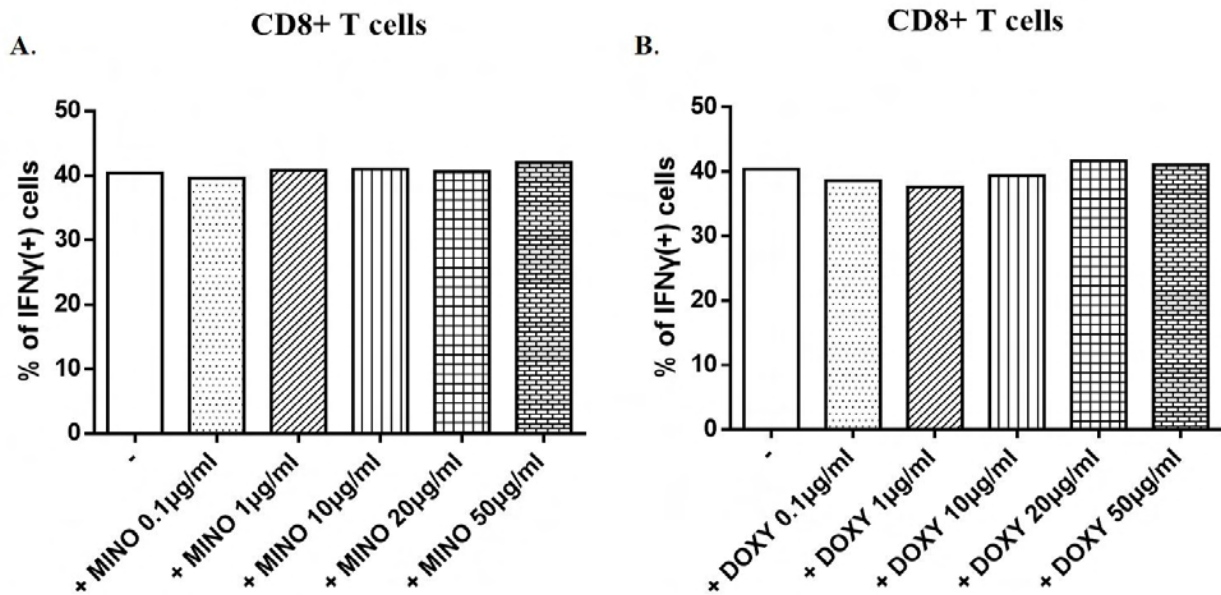
Εικόνα 12.5: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων (Α) μινοκυκλίνης και (Β) δοξυκυκλίνης σε CD4+ T λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με IL-12 /IL-18. Είναι εμφανής η πτώση στην παραγωγή IFN- γ και για τις δύο τετρακυκλίνες με μέγιστη συγκέντρωση επίδρασης να είναι η δόση των 50 μ g/ml.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα CD8+ T έπειτα από διέγερση με PMA/Ιονομυκίνη και IL-12/IL-18.

Όσον αφορά τα CD8+ T λεμφοκύτταρα όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.6** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη επίσης δεν υπήρξε μεταβολή της παραγωγής IFN- γ σε καμία δόση τόσο της μινοκυκλίνης όσο και της δοξυκυκλίνης. Αντιθέτως, όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.7** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία της μινοκυκλίνης ή της δοξυκυκλίνης. Ειδικότερα, η ελάττωση των IFN+ CD8+ T λεμφοκυττάρων κυμάνθηκε:

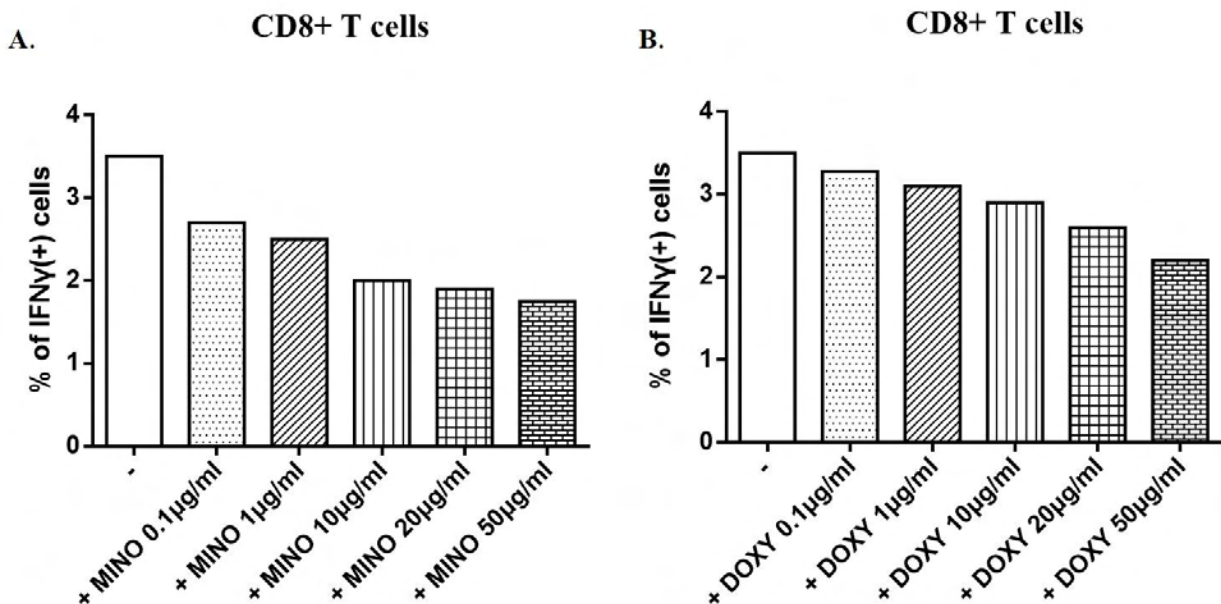
- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης από 23% στην δόση 0.1 μ g/ml έως 52% στην δόση 50 μ g/ml.
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης από 7% στην δόση 0.1 μ g/ml έως 38% στην δόση 50 μ g/ml.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+IONOMYKINH



Εικόνα 12.6: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων (Α) μινοκυκλίνης και (Β) δοξυκυκλίνης σε CD8+ T λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18



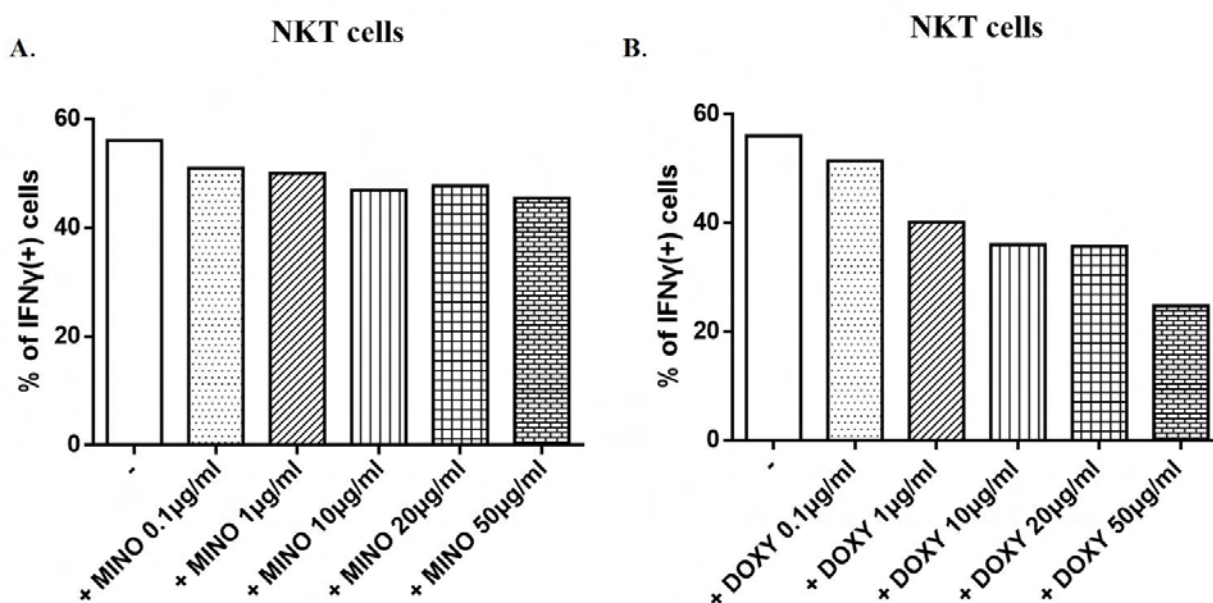
Εικόνα 12.7: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων (Α) μινοκυκλίνης και (Β) δοξυκυκλίνης σε CD8+ T λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) μινουκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα NKT έπειτα από διέγερση με PMA/Ιονομυκίνη και IL-12/IL-18.

Όσον αφορά τα NKT λεμφοκύτταρα όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.8** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη υπήρξε οριακή μείωση των IFN+ NKT λεμφοκυττάρων:

- Παρουσία μινουκυκλίνης από 9% στην δόση 0.1 μ g/ml έως 19% στην δόση 50 μ g/ml.
- Παρουσία δοξυκυκλίνης από 10% στην δόση 0.1 μ g/ml έως 52% στην δόση 50 μ g/ml.

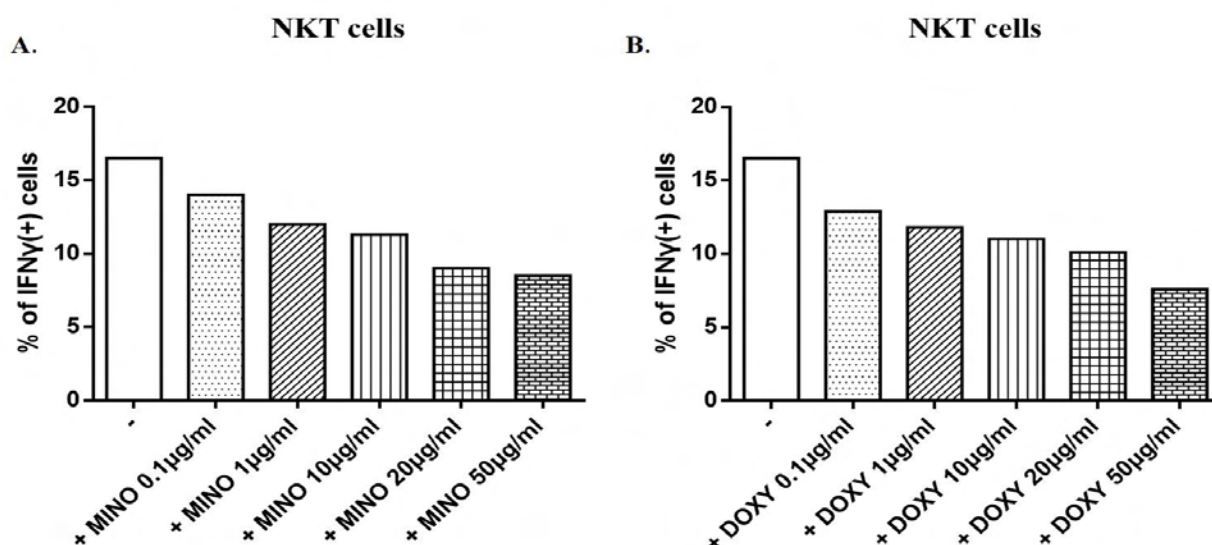
ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+ΙΟΝΟΜΥΚΙΝΗ



Εικόνα 12.8: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων (A) μινουκυκλίνης και (B) δοξυκυκλίνης σε NKT λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη. Παρατηρείται οριακή μείωση των NKT κυττάρων που παράγουν IFN- γ , κυρίως παρουσία δοξυκυκλίνης στην δόση 50 μ g/ml.

Επίσης, όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.9** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία και των δύο τετρακυκλινών. Ειδικότερα, η ελάττωση των IFN+ NKT λεμφοκυττάρων κυμάνθηκε:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινουκυκλίνης από 16% στην δόση 0.1 μ g/ml έως 53% στην δόση 50 μ g/ml.
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης από 22% στην δόση 0.1 μ g/ml έως 55% στην δόση 50 μ g/ml.



Εικόνα 12.9: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων (Α) μινοκυκλίνης και (Β) δοξυκυκλίνης σε NKT λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. Είναι εμφανής η σταδιακή μείωση της παραγωγής IFN-γ από τα NKT κύτταρα και για τα δύο αντιβιοτικά

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN-γ από κύτταρα NK έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη και IL-12 και IL-18.

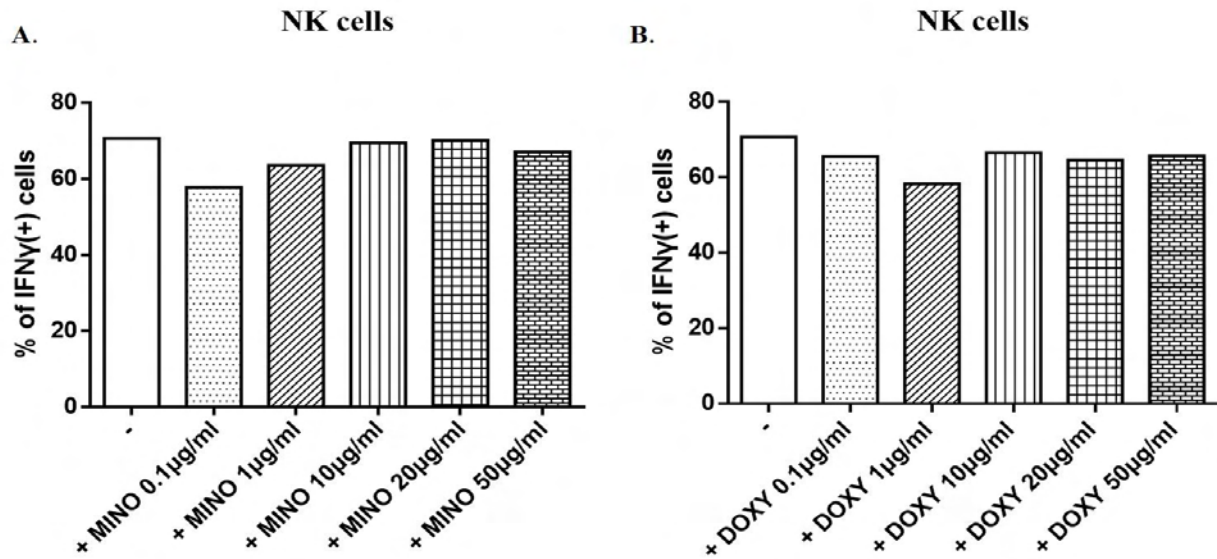
Όσον αφορά τα NK λεμφοκύτταρα όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.10** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη υπήρξε οριακή μείωση των IFN+ NK λεμφοκυττάρων:

- Παρουσία μινοκυκλίνης 19% στην δόση 0.1 μg/ml και 11% στην δόση 1 μg/ml. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε μείωση των IFN+ NK λεμφοκυττάρων παρουσία μινοκυκλίνης στις δόσεις μεγαλύτερες του 1 μg/ml.
- Παρουσία δοξυκυκλίνης 10% στην δόση 0.1 μg/ml και 18% στην δόση 1 μg/ml. Όπως και με την μινοκυκλίνη δεν παρατηρήθηκε μείωση πάνω από 10% των IFN+ NK λεμφοκυττάρων στις δόσεις δοξυκυκλίνης μεγαλύτερες του 1 μg/ml.

Αντιθέτως, όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.11** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της παραγωγής IFN-γ παρουσία και των δύο τετρακυκλινών. Ειδικότερα, η ελάττωση των IFN+ NK λεμφοκυττάρων κυμάνθηκε:

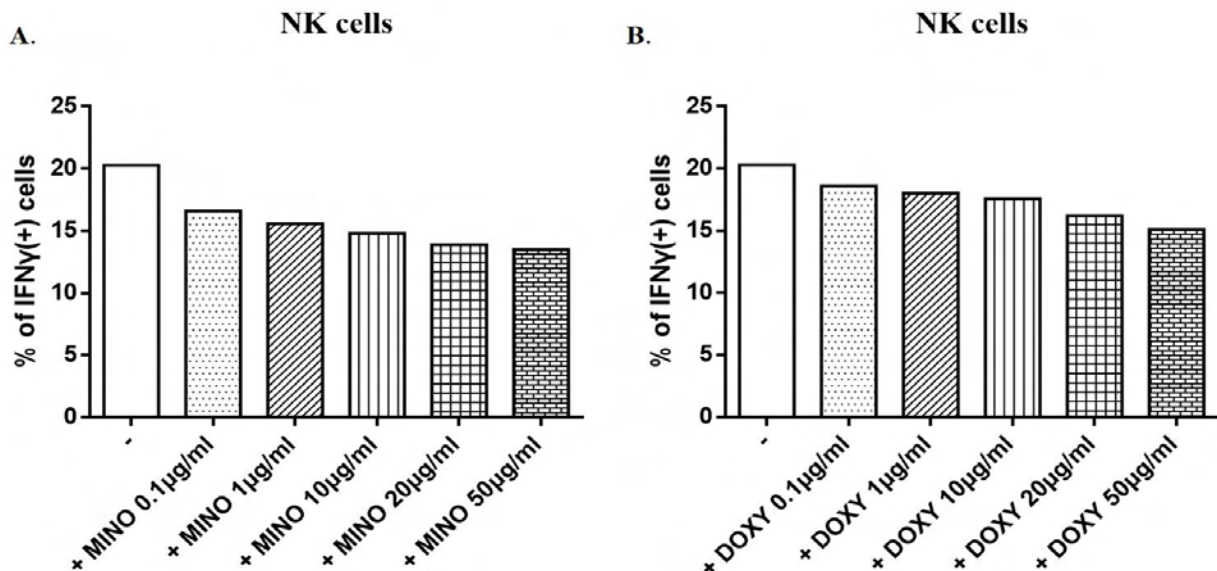
- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης από 19% στην δόση 0.1 μg/ml έως 34% στην δόση 50 μg/ml.
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης από 10% στην δόση 0.1 μg/ml έως 26% στην δόση 50 μg/ml.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+IONOMYKINH



Εικόνα 12.10: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων συγκεντρώσεων (Α) μινοκυκλίνης και (Β) δοξυκυκλίνης σε NK λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη. Δεν παρατηρείται μείωση των IFN+ NK λεμφοκυττάρων παρουσία και των δύο τετρακυκλινών σε δόσεις μεγαλύτερες του 1μg/ml

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

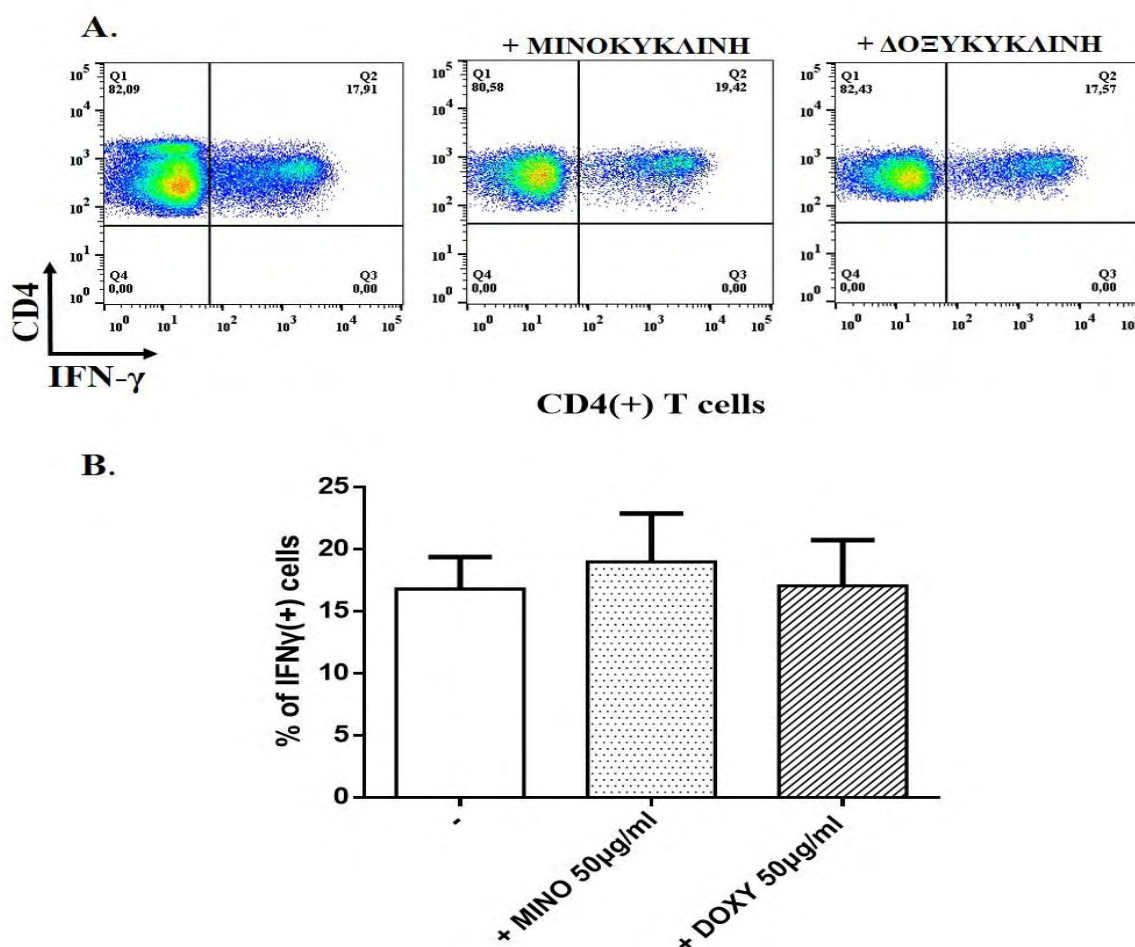


Εικόνα 12.11: Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων τετρακυκλινών σε NK λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18.

Επίδραση βέλτιστης δοσολογίας μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα CD4+ T υγιών μαρτύρων έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη και IL-12 και IL-18.

Με βάση τα δεδομένα του πειράματος dose response και σύμφωνα πάντα με την προτεινόμενη από την βιβλιογραφία φαρμακευτική δοσολογία τετρακυκλινών *in vivo* σε ασθενείς των κλινικών μελετών με PA και ΣκΠ (Κεφάλαια 9.4, 9.5 και 11.5), επιλέχθηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση αντιβιοτικών τα 50 μ g/ml. Στην συγκέντρωση διατηρήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων και παρατηρήθηκε η μέγιστη ελάττωση IFN+ λεμφοκυτταρικών πληθυσμών έπειτα από διέγερση με PMA/Ιονομυκίνη όπως επίσης και με IL-12/IL-18. Μεταξύ των δύο μεθόδων διέγερσης υπήρξαν διαφορές όσον αφορά την ποσοστιαία παραγωγή IFN- γ όπως και στην ανταπόκριση παρουσία τετρακυκλινών. Στη συνέχεια και για να διερευνηθούν στατιστικά οι διαφαινόμενες επιδράσεις των τετρακυκλινών διεξήχθησαν πειράματα σε PBMCs από 10 υγιείς μάρτυρες.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+ΙΟΝΟΜΥΚΙΝΗ



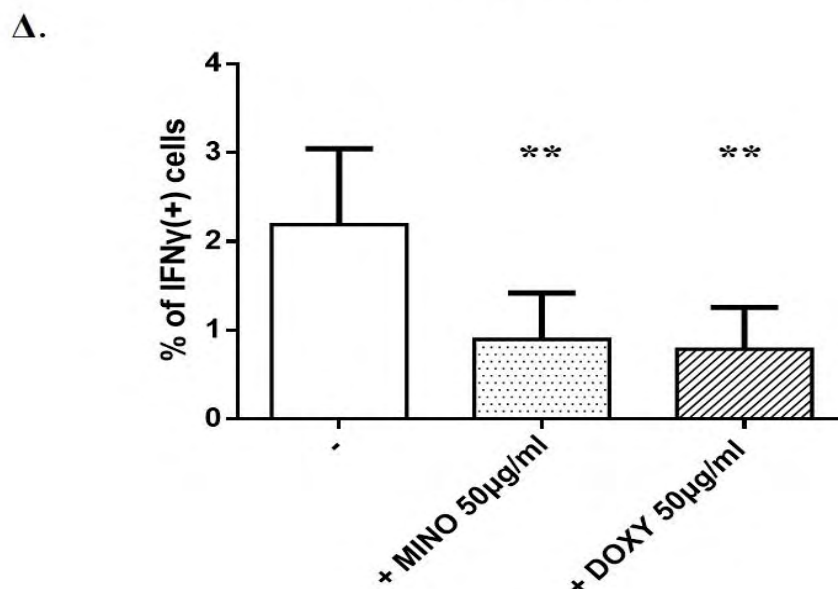
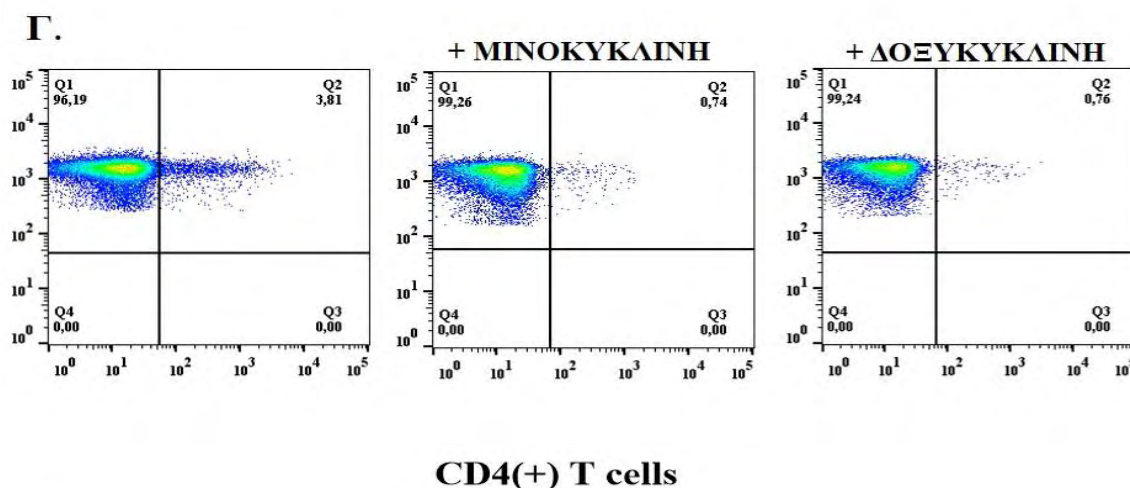
Εικόνα 12.12: Α) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Β) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε CD4+ T λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη.

Όσον αφορά τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.12** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN- γ για την επιλεγμένη δόση τόσο της μινοκυκλίνης όσο και της δοξυκυκλίνης.

Αντιθέτως, όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.13** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία και για την μινοκυκλίνη και για την δοξυκυκλίνη στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml. Ειδικότερα η ελάττωση των IFN⁺ CD4⁺ λεμφοκυττάρων:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης ήταν $58.1 \pm 8.8\%$ ($p=0.002$ $n=10$).
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $66.8 \pm 6.9\%$ ($p=0.003$ $n=10$).

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

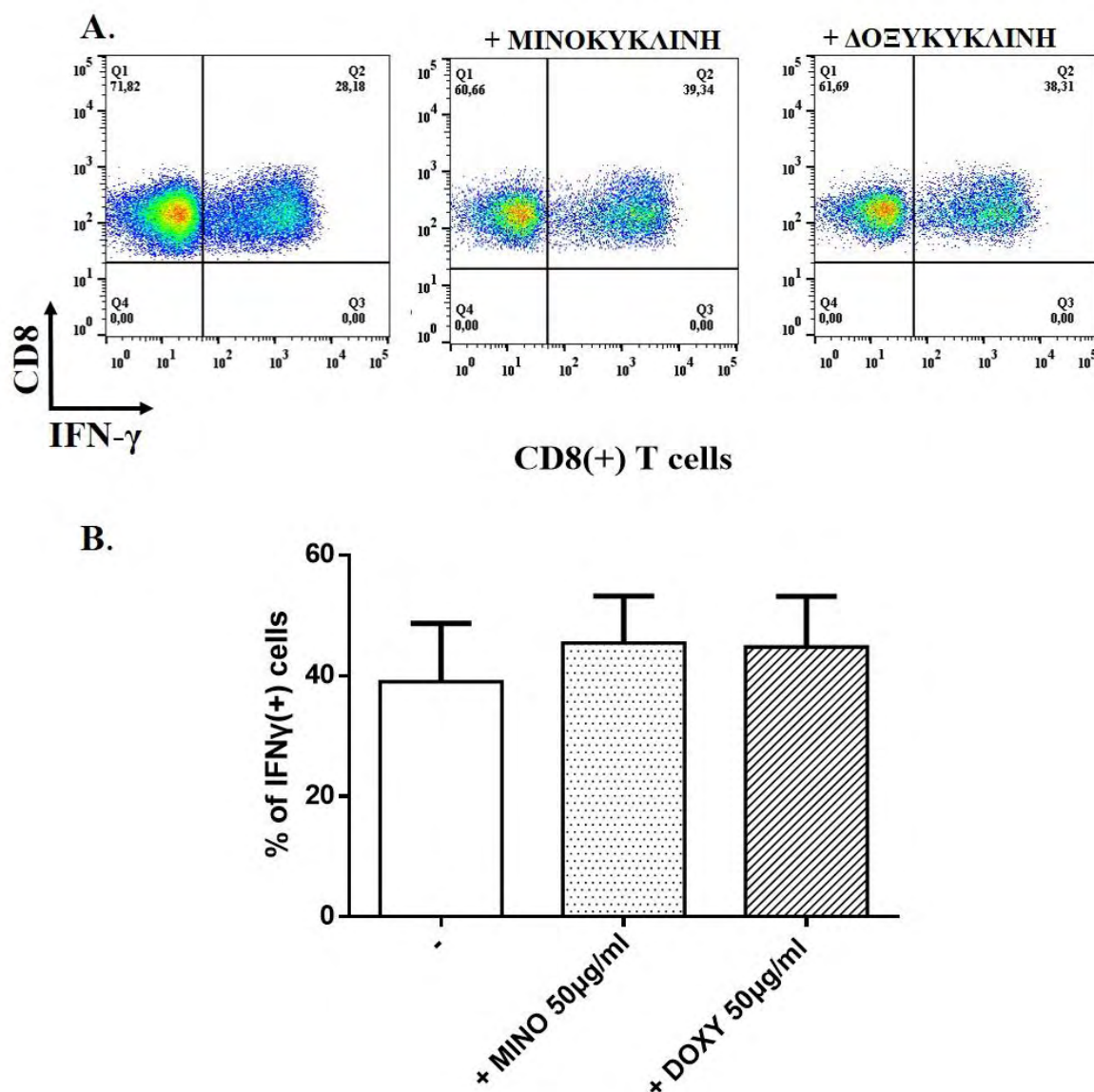


Εικόνα 12.13: Γ) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Δ) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε CD4⁺ T λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. (** $p<0.005$).

Επίδραση βέλτιστης δοσολογίας μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα CD8+ T υγιών μαρτύρων έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη και IL-12 και IL-18.

Όσον αφορά τα CD8+ T λεμφοκύτταρα όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.14** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN- γ για την επιλεγμένη δόση τόσο της μινοκυκλίνης όσο και της δοξυκυκλίνης.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+ΙΟΝΟΜΥΚΙΝΗ

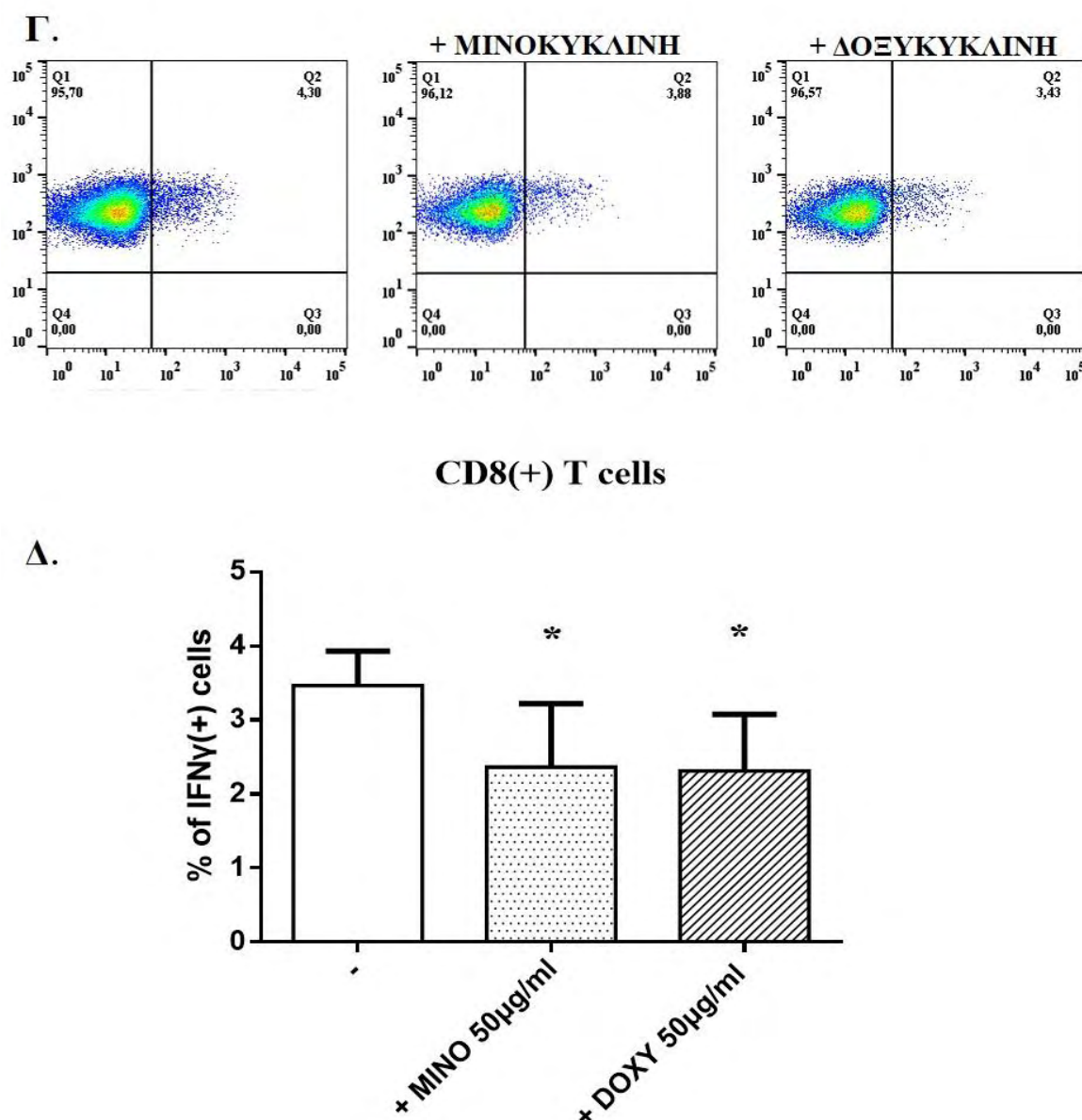


Εικόνα 12.14: A) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και B) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε CD8+ T λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN- γ για την επιλεγμένη δόση τόσο της μινοκυκλίνης όσο και της δοξυκυκλίνης.

Αντίθετα, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.15** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία και των δύο τετρακυκλινών στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml. Ειδικότερα η ελάττωση των IFN+ CD8+ λεμφοκυττάρων:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης ήταν $33.3 \pm 8.2\%$ ($p=0.02$ $n=10$).
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $34.0 \pm 7.1\%$ ($p=0.03$ $n=10$).

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

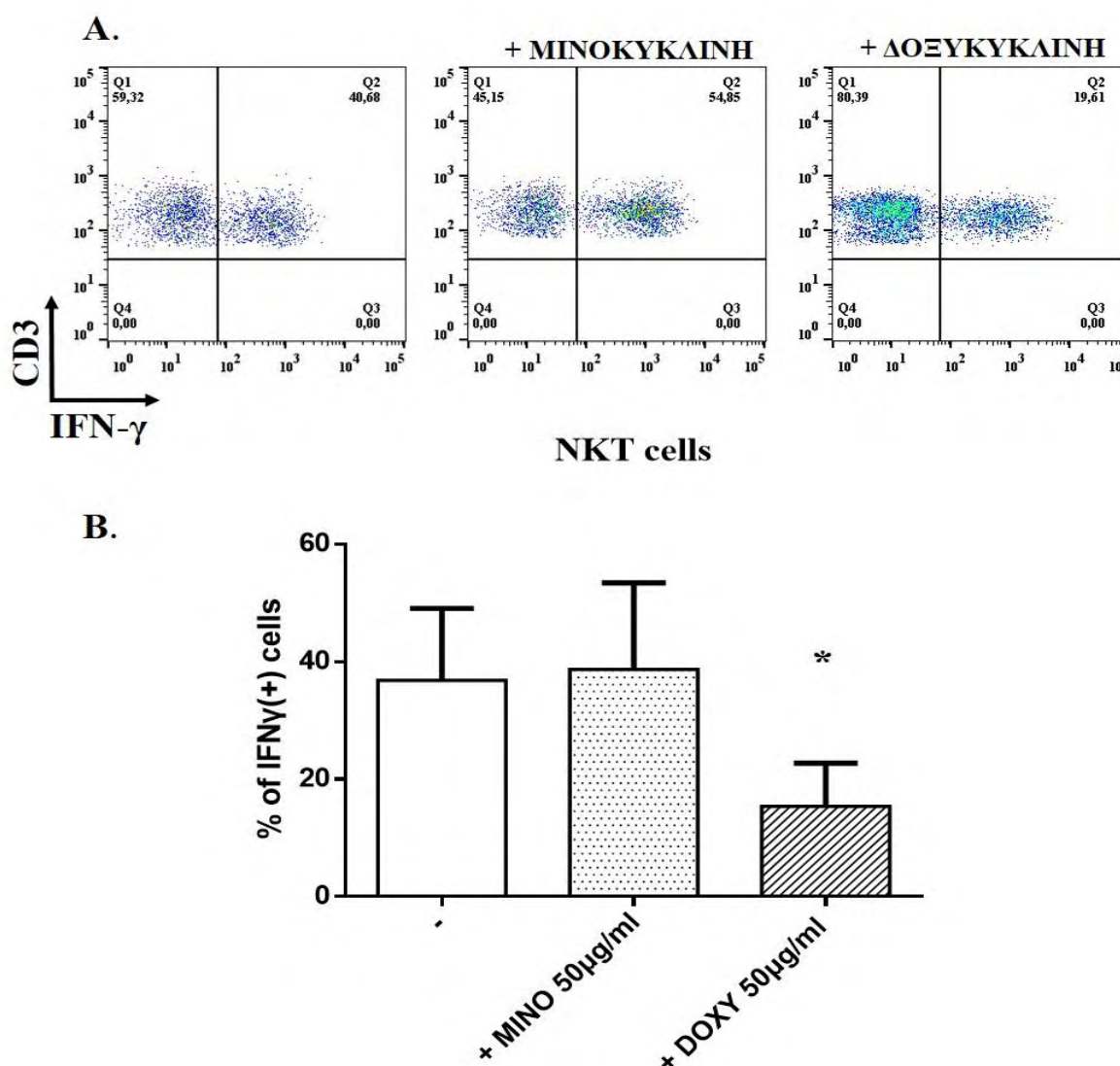


Εικόνα 12.15: Γ) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Δ) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε CD8+ T λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. (* $p<0.05$). Παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ .

Επίδραση βέλτιστης δοσολογίας μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα NKT υγιών μαρτύρων έπειτα απο διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη και IL-12 και IL-18.

Όσον αφορά τα NKT λεμφοκύτταρα όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.16** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη υπήρξε στατιστικά σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN- γ στην δόση 50 μ g/ml της δοξυκυκλίνης αλλά όχι της μινοκυκλίνης. Πιο συγκεκριμένα η ελάττωση των IFN+ NKT λεμφοκυττάρων όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $60.1 \pm 3.9\%$ ($p=0.03$ $n=10$).

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+ΙΟΝΟΜΥΚΙΝΗ

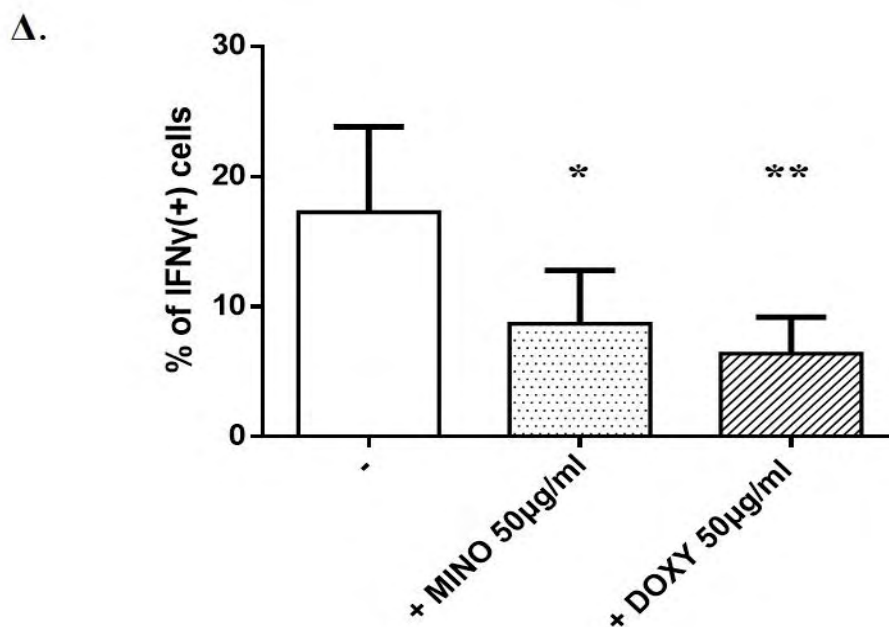
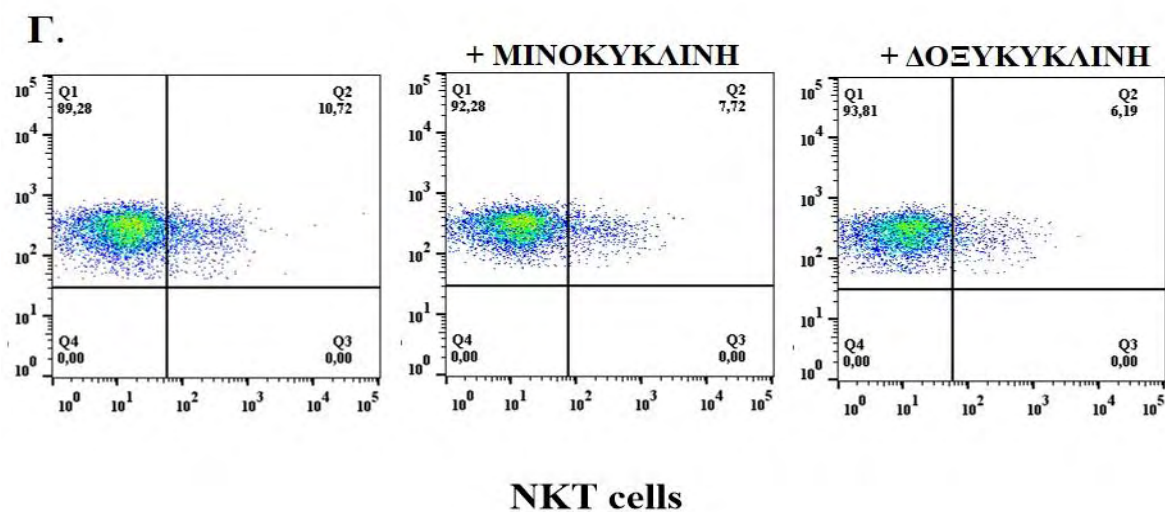


Εικόνα 12.16: A) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και B) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε NKT λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη (* $p<0.05$). Στατιστικά σημαντική η μεταβολή της παραγωγής IFN- γ στην δόση 50 μ g/ml της δοξυκυκλίνης αλλά όχι της μινοκυκλίνης.

Από την άλλη πλευρά, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.17** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία μινοκυκλίνης ή δοξυκυκλίνης στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml. Ειδικότερα η μείωση των IFN+ NKT λεμφοκυττάρων:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης ήταν $45.8 \pm 9.8\%$ ($p=0.03$ $n=10$).
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $59 \pm 7.1\%$ ($p=0.003$ $n=10$).

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

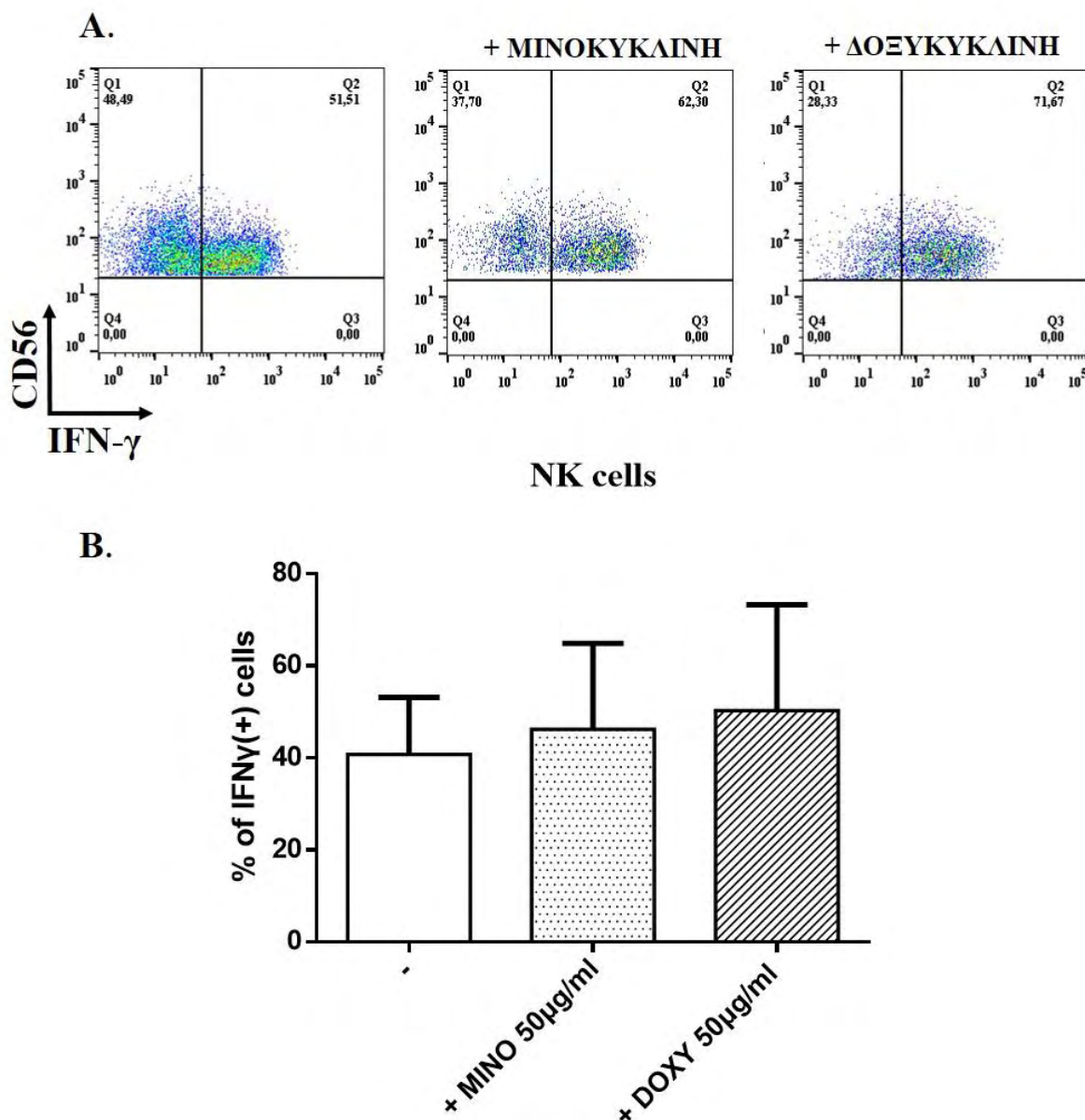


Εικόνα 12.17: Γ) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Δ) γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε NKT λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. (* $p<0.05$) (** $p<0.005$).

Επίδραση βέλτιστης δοσολογίας μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα NK υγιών μαρτύρων έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη και IL-12 και IL-18.

Όσον αφορά τα NK λεμφοκύτταρα όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.18** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN- γ για την επιλεγμένη δόση τόσο της μινοκυκλίνης όσο και της δοξυκυκλίνης.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+ΙΟΝΟΜΥΚΙΝΗ

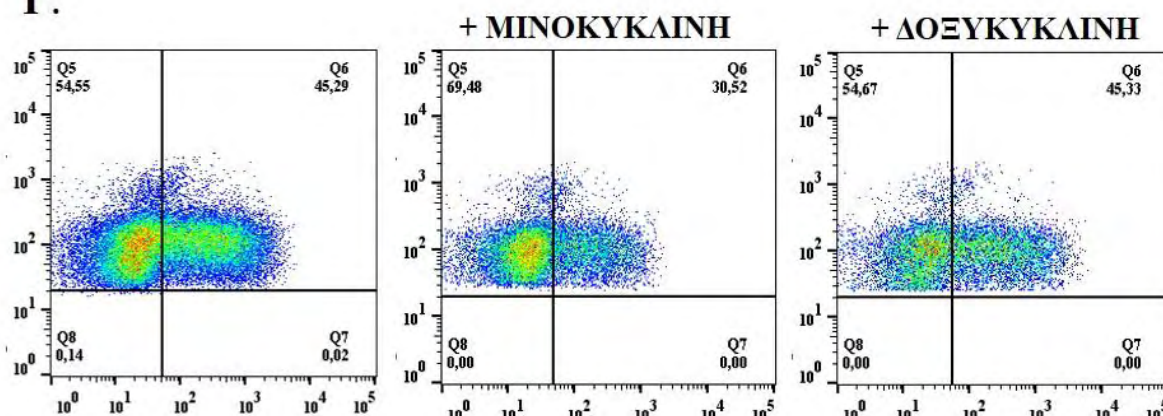


Εικόνα 12.18: A) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και B) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50 μ g/ml σε NK λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη. Δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN- γ και για τις δυο τετρακυκλίνες.

Παραδόξως, και σε αντίθεση με την απόκριση στο dose response πείραμα, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.19** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18 δεν υπήρξε επίσης στατιστικά σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN- γ για την επιλεγμένη δόση τόσο της μινοκυκλίνης όσο και της δοξυκυκλίνης.

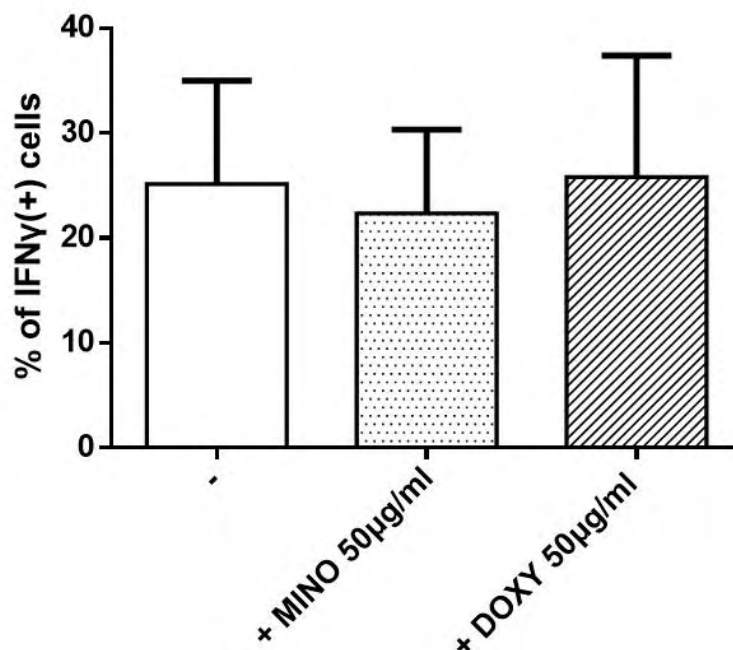
ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

Γ.



NK cells

Δ.

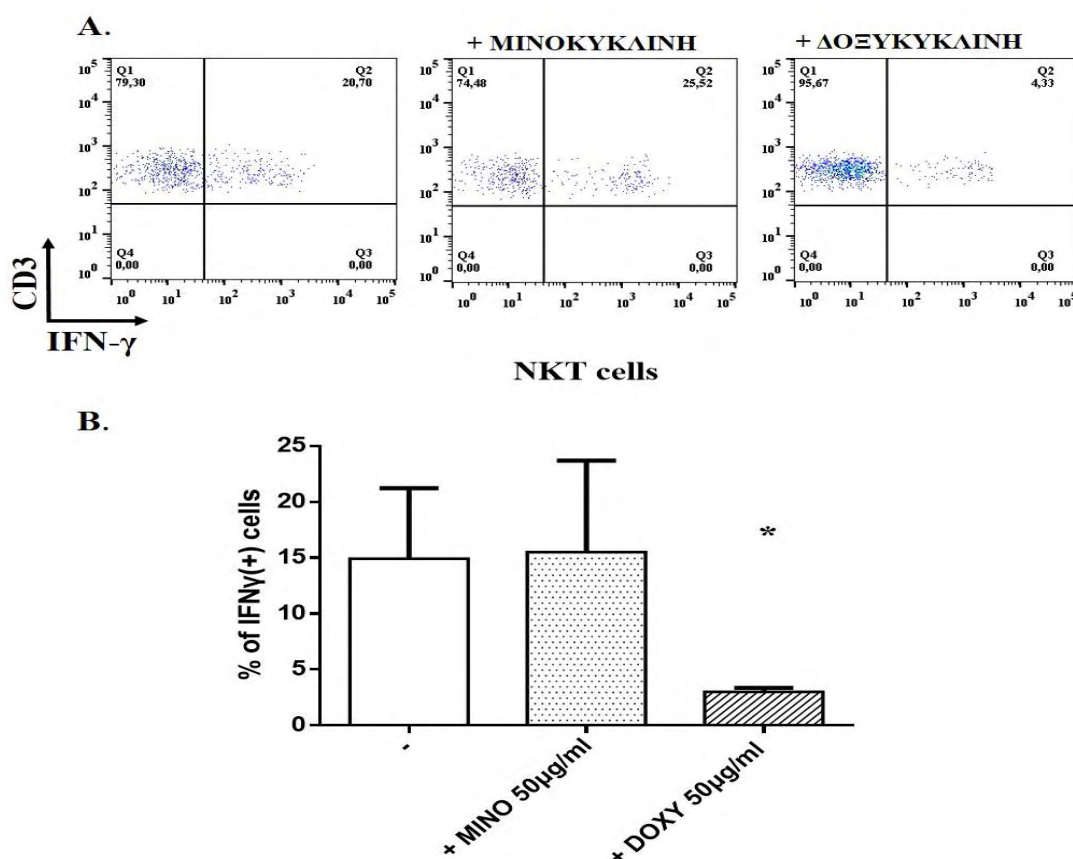


Εικόνα 12.19: Γ) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Δ) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε NK λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. Δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN- γ για την επιλεγμένη δόση τόσο της μινοκυκλίνης όσο και της δοξυκυκλίνης.

Επίδραση βέλτιστης δοσολογίας μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN-γ από κύτταρα ασθενών με RRMS έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη και IL-12 και IL-18.

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα σε PBMCs υγιών μαρτύρων, στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFNγ παρουσία 50μg/ml τετρακυκλινών παρατηρήθηκε στους υποπληθυσμούς των NKT, CD4+ T και CD8+ T λεμφοκυττάρων έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18. Όσον αφορά την διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση IFNγ+ κυτταρικών υποπληθυσμών με εξαίρεση τα NKT παρουσία 50μg/ml δοξυκυκλίνης μόνο. Η επίδραση των τετρακυκλινών διερευνήθηκε επίσης σε PBMCs ασθενών με RRMS. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.20** έπειτα από διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη υπήρξε επίσης στατιστικά σημαντική μεταβολή της παραγωγής IFN-γ για την επιλεγμένη δόση της δοξυκυκλίνης όσον αφορά τα NKT λεμφοκύτταρα ασθενών. Ειδικότερα η μείωση των IFN+ NKT λεμφοκυττάρων όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $78.1 \pm 2.0\%$ ($p=0.01$ $n=10$).

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+ΙΟΝΟΜΥΚΙΝΗ

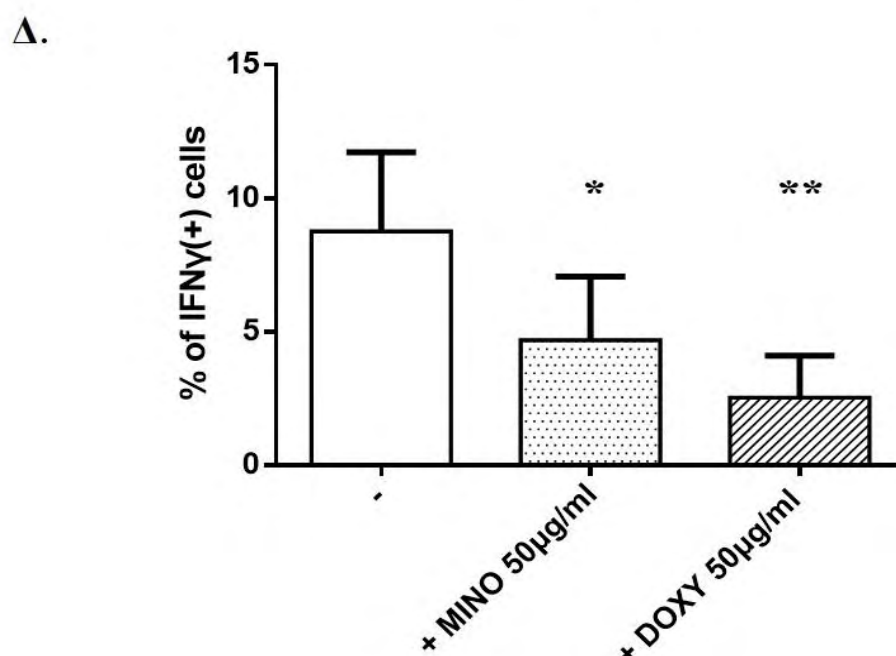
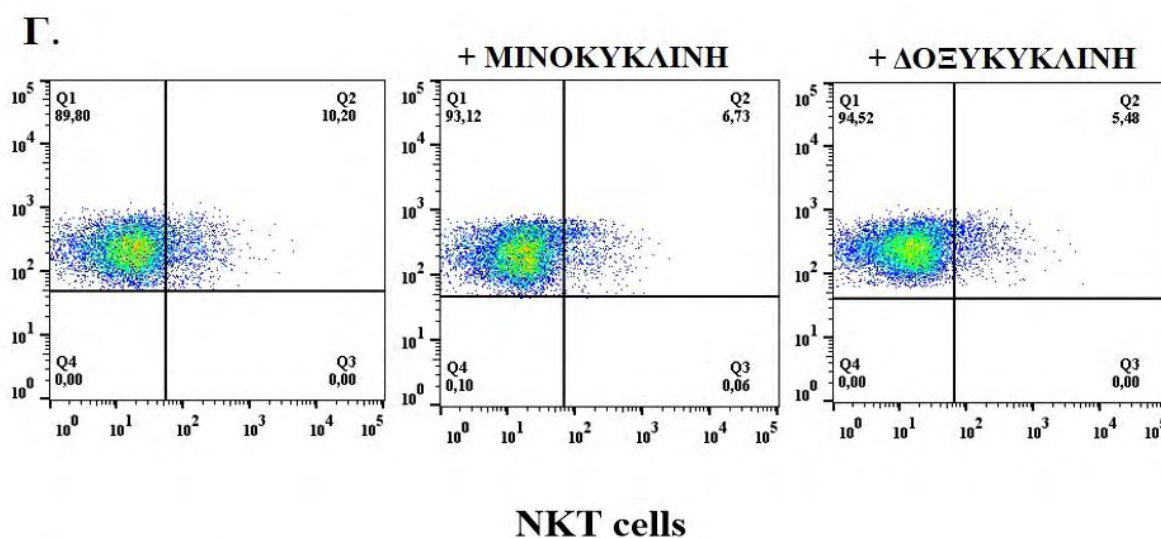


Εικόνα 12.20: Α) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Β) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50μg/ml σε NKT λεμφοκύτταρα ασθενών με RRMS ενεργοποιημένα με PMA και Ιονομυκίνη (* $p<0.05$).

Από την άλλη πλευρά όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.21** έπειτα από διέγερση των κυττάρων ασθενών με RRMS με IL-12 και IL-18, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία και των δύο τετρακυκλινών στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml. Ειδικότερα η μείωση των IFN+ NKT λεμφοκυττάρων:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης ήταν $47.7 \pm 4.8\%$ ($p=0.02$ $n=10$).
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $70.4 \pm 6.5\%$ ($p=0.001$ $n=10$).

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

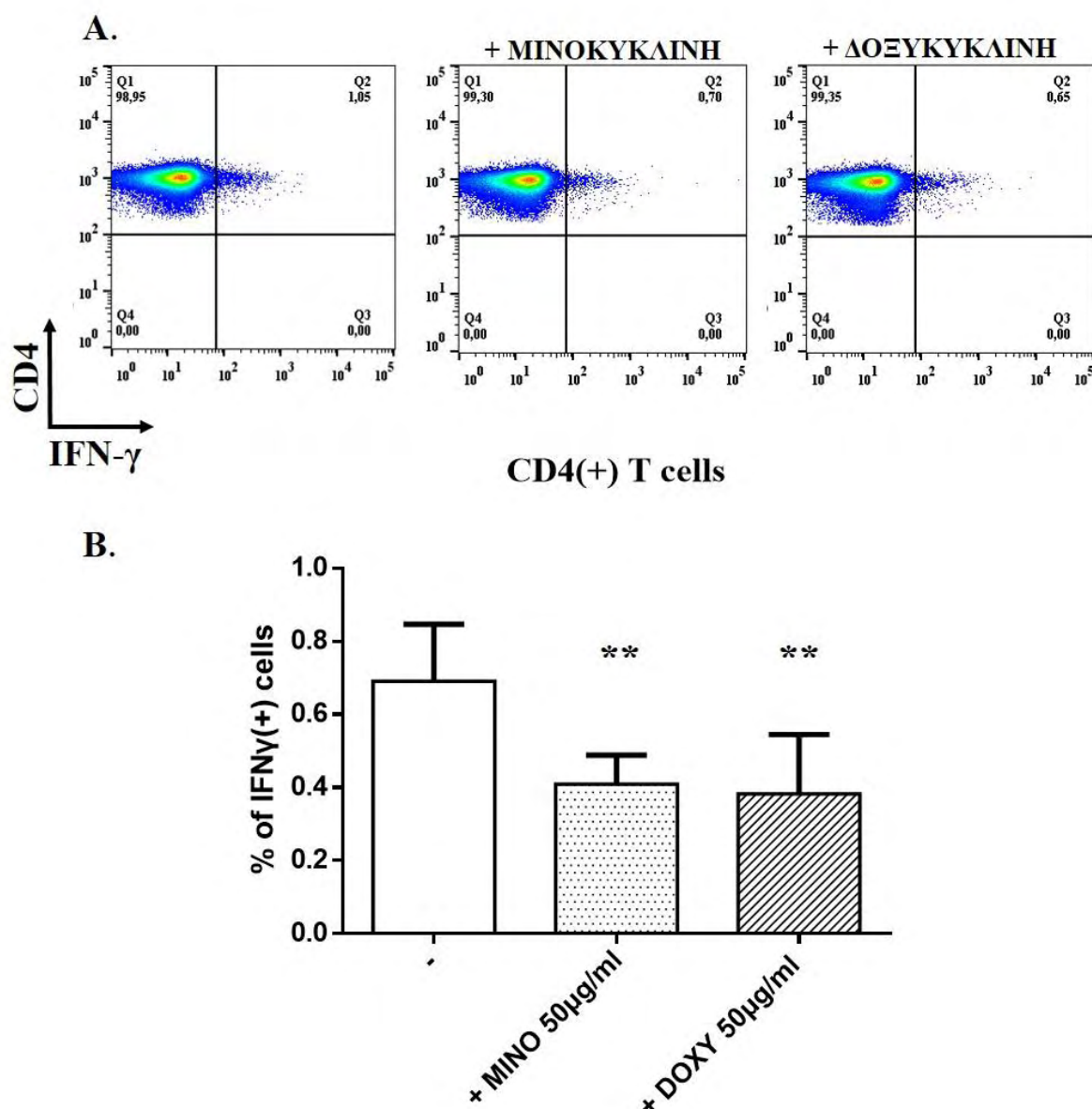


Εικόνα 12.21: Γ) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Δ) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50 μ g/ml σε NKT λεμφοκύτταρα ασθενών με RRMS ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. (* $p<0.05$) (** $p<0.005$)

Όσον αφορά την επίδραση των τετρακυκλινών στα CD4+ T λεμφοκύτταρα ασθενών με RRMS όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.22** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία και των δύο τετρακυκλινών στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml. Ειδικότερα η ελάττωση των IFN+ CD4+ λεμφοκυττάρων:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινोकυκλίνης ήταν $38.8 \pm 6.6\%$ ($p=0.004$ $n=10$).
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $44.5 \pm 8.7\%$ ($p=0.001$ $n=10$).

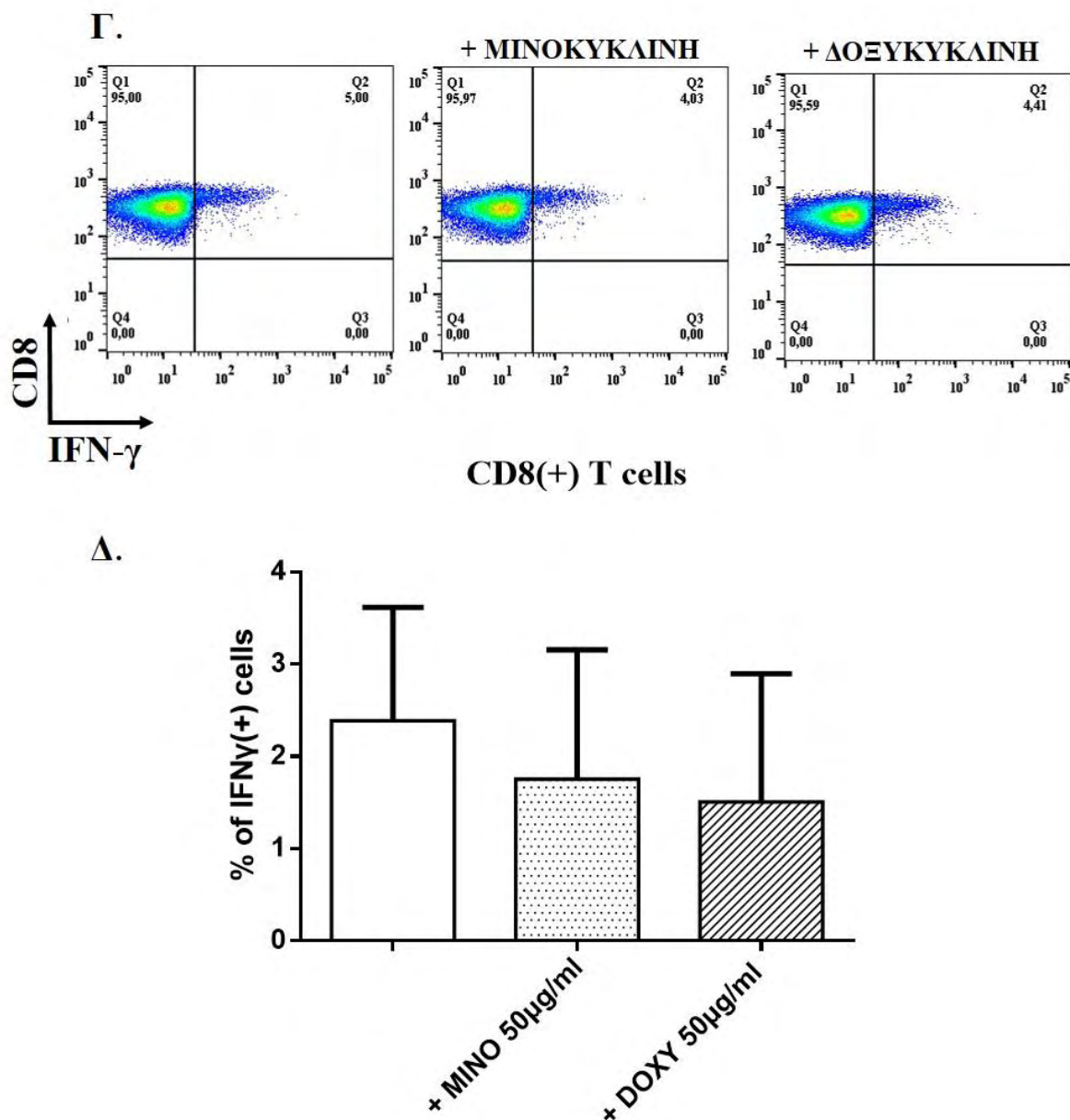
ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18



Εικόνα 12.22: Α) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Β) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50 μ g/ml σε CD4+ T λεμφοκύτταρα ασθενών με RRMS ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. (** $p<0.005$). Παρατηρείται μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία και των δύο τετρακυκλινών στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml.

Αντιθέτως, όσον αφορά την επίδραση των τετρακυκλινών στα CD8+ T λεμφοκύτταρα ασθενών με RRMS δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των IFN- γ + CD8+ λεμφοκυττάρων έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18 (Εικόνα 12.23) όπως είχε παρατηρηθεί στους υγιείς μάρτυρες στην δοσολογία των 50 μ g/ml τετρακυκλινών.

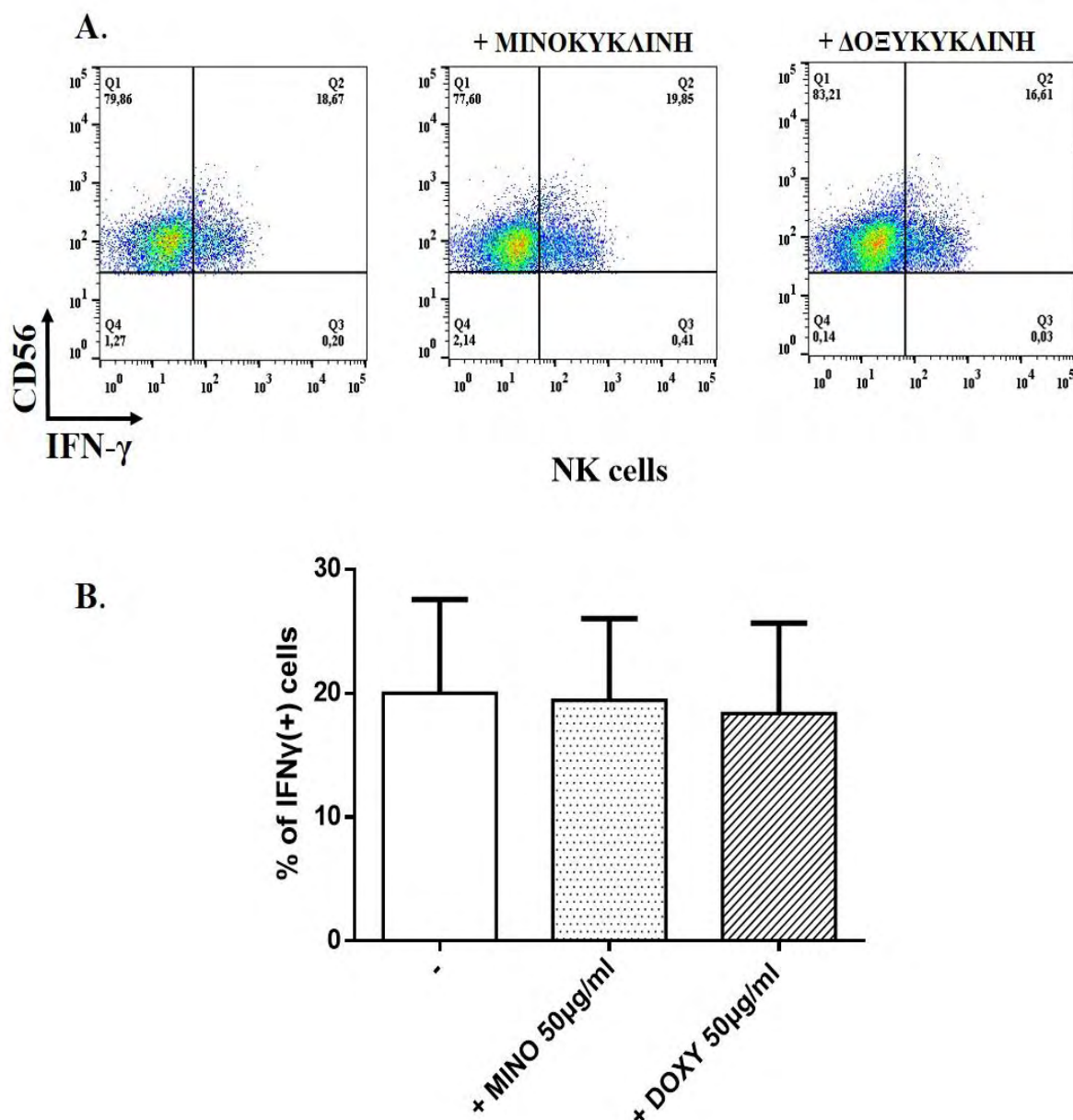
ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18



Εικόνα 12.23: Γ) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Δ) γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε CD8+ T λεμφοκύτταρα ασθενών με RRMS ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των IFN γ + CD8+ λεμφοκυττάρων έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18.

Επίσης, όσον αφορά την επίδραση των τετρακυκλινών στα NK λεμφοκύτταρα ασθενών με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ΚΠΣ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των IFN- γ + NK λεμφοκυττάρων έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18 (Εικόνα 12.24) κατά συμφωνία και με τα δεδομένα στα NK κύτταρα από υγιείς μάρτυρες στην δοσολογία των 50 μ g/ml τετρακυκλινών.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18



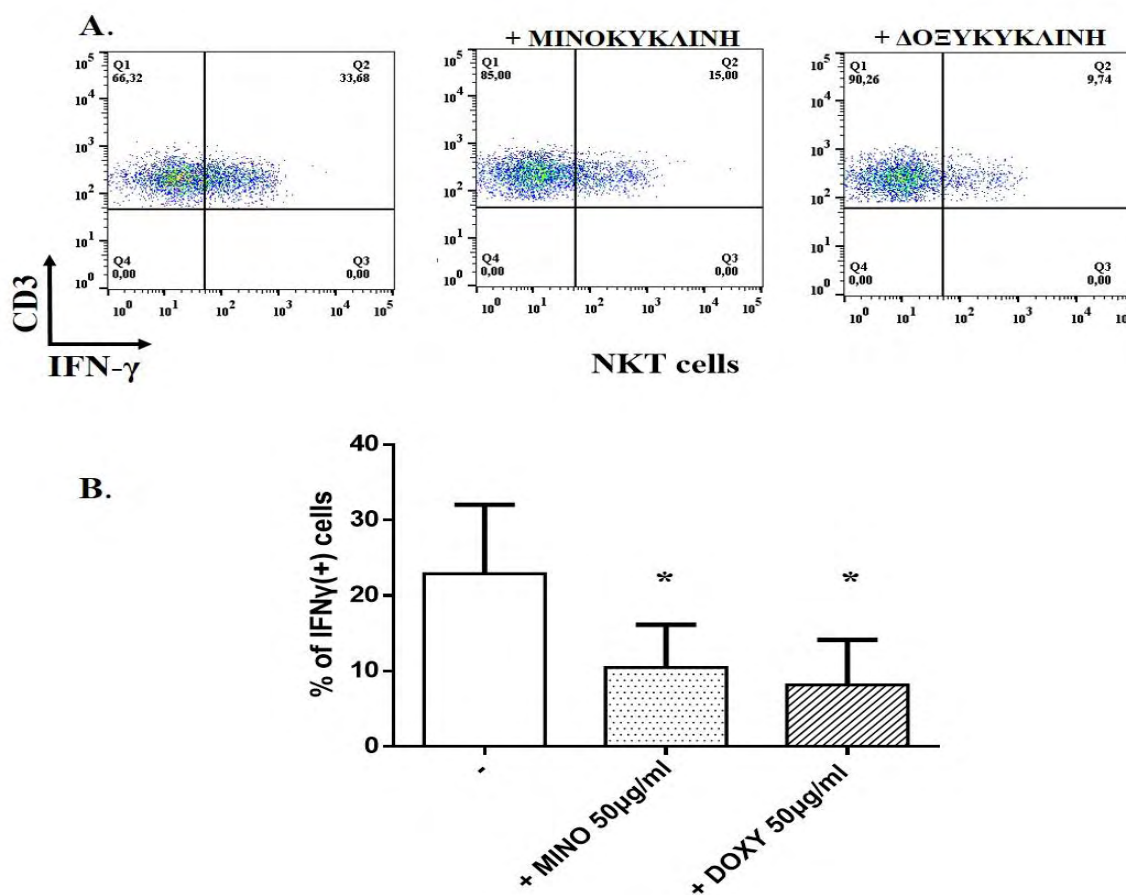
Εικόνα 12.24: Α) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Β) γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50 μ g/ml σε CD8+ T λεμφοκύτταρα ασθενών με RRMS ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των IFN- γ + NK λεμφοκυττάρων έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18.

Επίδραση βέλτιστης δοσολογίας μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα πρωτοδιαγνωσθέντων ασθενών με ΣκΠ (naïve MS) έπειτα από διέγερση με PMA/Ιονομυκίνη και IL-12/IL-18.

Παράλληλα με τους ασθενείς RRMA διεξήχθησαν πειράματα και σε συλλεγμένα PBMCs από 5 πρωτοδιαγνωσμένους ασθενείς με ΣκΠ που δεν ελάμβαναν θεραπεία. Η επίδραση των τετρακυκλινών διερευνήθηκε στα κύτταρα αυτά κατά τον ίδιο τρόπο ώστε να γίνει συγκριτικός έλεγχος με τα αποτελέσματα των ασθενών με RRMS υπό θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα και όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.25** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18 παρουσία δοσολογίας 50 μ g/ml τετρακυκλινών υπήρξε στατιστική μείωση των IFN γ + NKT λεμφοκυττάρων. Ειδικότερα η μείωση των IFN+ NKT λεμφοκυττάρων:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης ήταν $56.7 \pm 4.7\%$ ($p=0.04$ $n=5$).
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $68.2 \pm 6.0\%$ ($p=0.03$ $n=5$).

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

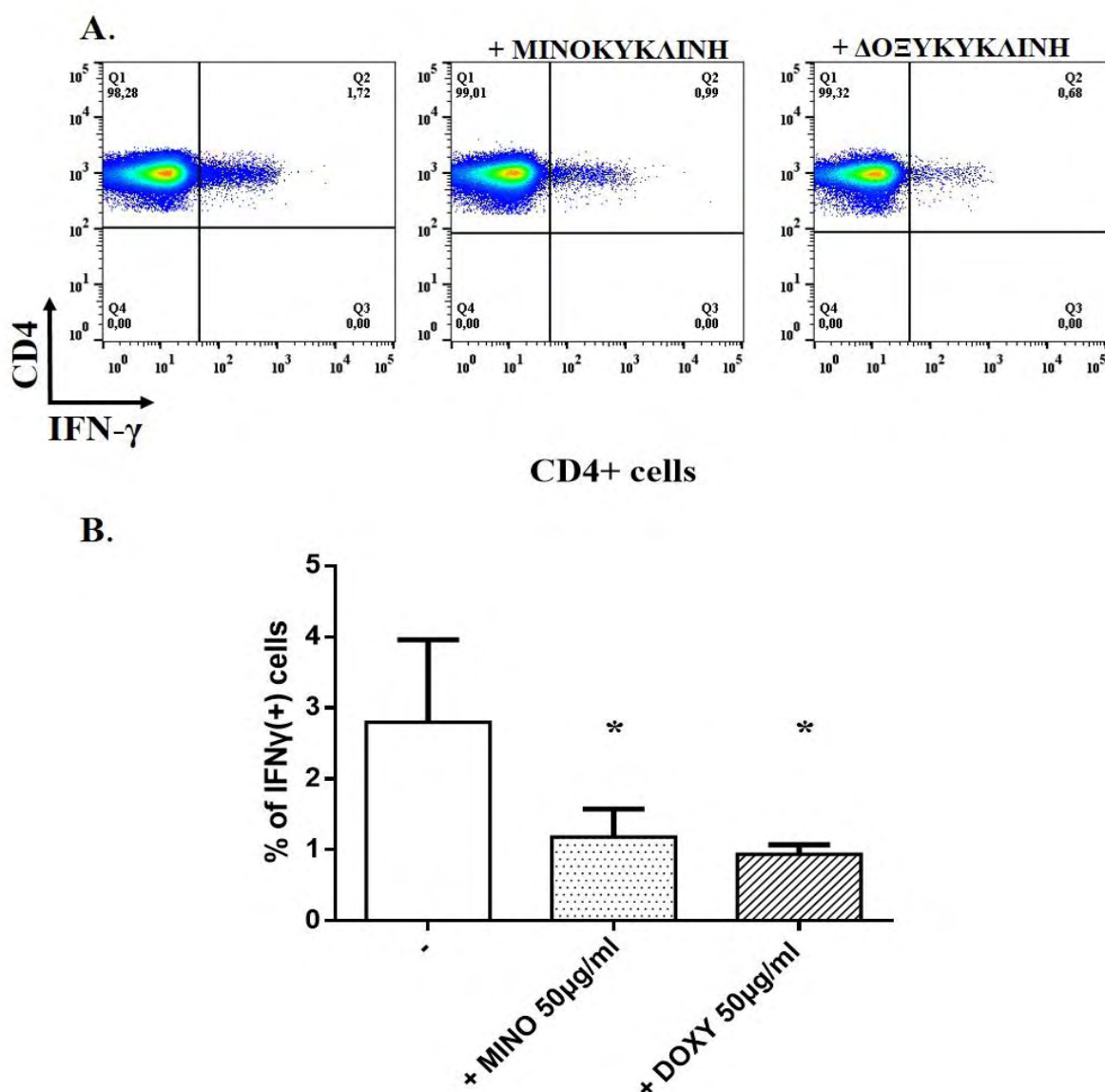


Εικόνα 12.25: Α) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Β) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50 μ g/ml σε NKT λεμφοκύτταρα naïve ασθενών με ΣκΠ ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. (* $p < 0.05$).

Επίσης, όσον αφορά την επίδραση των τετρακυκλινών στα CD4+ T λεμφοκύτταρα παίει ασθενών με ΣκΠ όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.26** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18, παρατηρήθηκε εξίσου στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία και των δύο τετρακυκλινών στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml. Ειδικότερα η ελάττωση των IFN+ CD4+ λεμφοκυττάρων:

- Όσον αφορά την επίδραση της μινοκυκλίνης ήταν $56.0 \pm 6.5\%$ ($p=0.03$ $n=5$).
- Όσον αφορά την επίδραση της δοξυκυκλίνης ήταν $62.2 \pm 6.3\%$ ($p=0.02$ $n=5$).

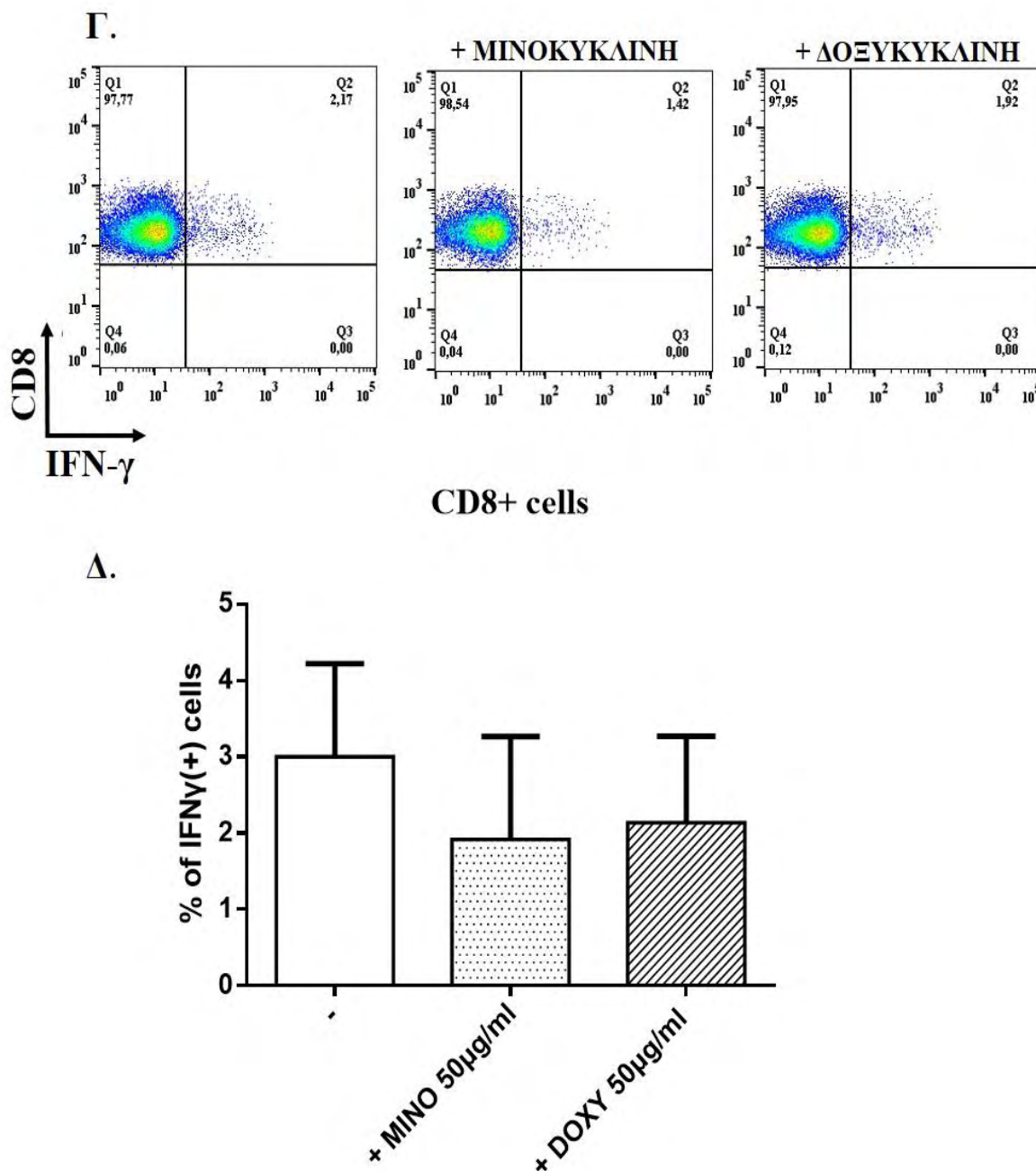
ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18



Εικόνα 12.26: Α) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Β) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50 μ g/ml σε CD4+ T λεμφοκύτταρα παίει ασθενών με ΣκΠ ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. (* $p<0.05$). Υπήρξε σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ παρουσία και των δύο τετρακυκλινών στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml.

Αντίθετα, όσον αφορά την επίδραση των τετρακυκλινών στα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα παίνε ασθενών ΣκΠ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των IFN γ ⁺ CD8⁺ λεμφοκυττάρων έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18 (Εικόνα 12.27) κατά συμφωνία και με τα δεδομένα ασθενών με RRMS στην δοσολογία των 50 μ g/ml τετρακυκλινών.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

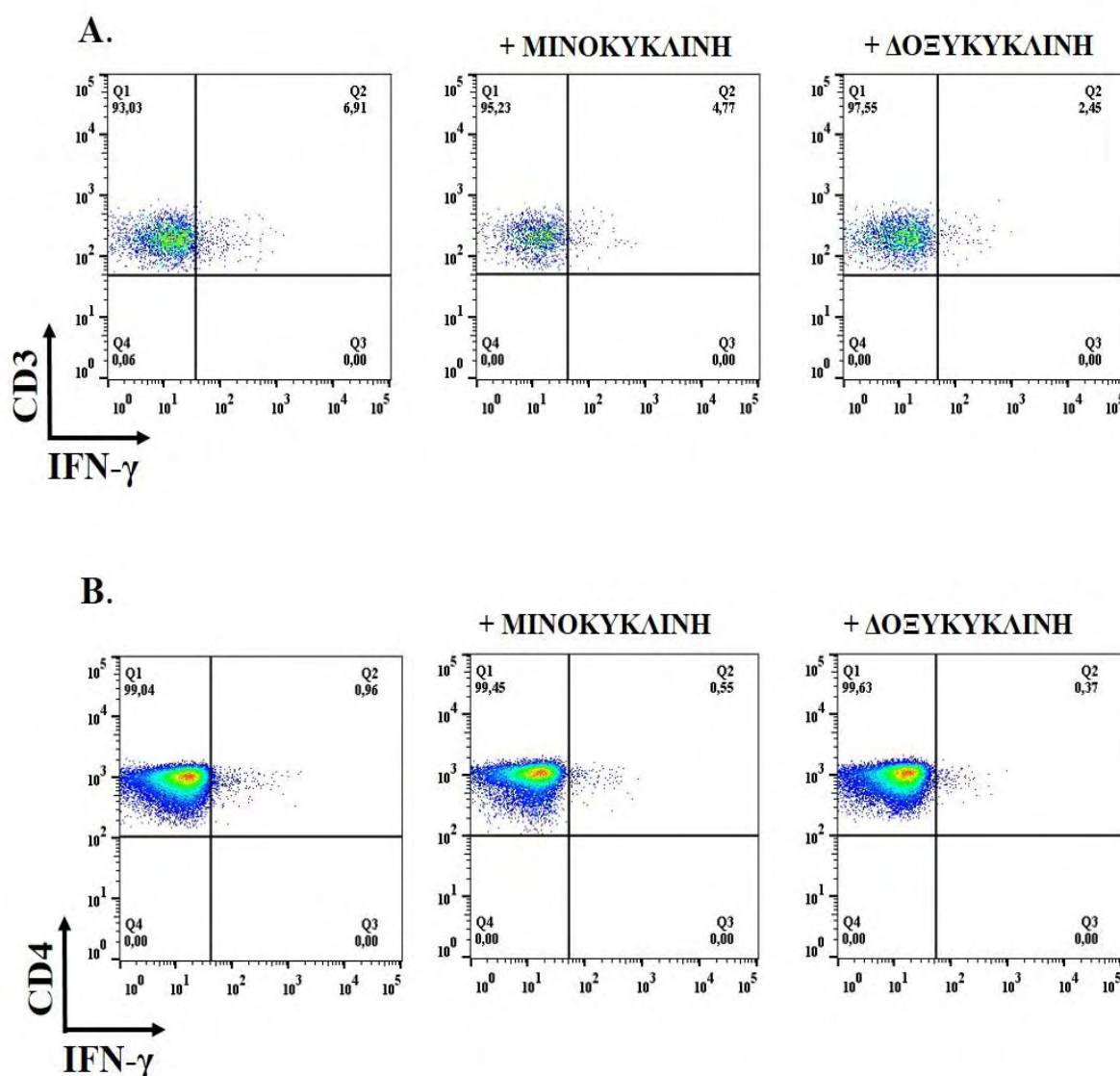


Εικόνα 12.27: Γ) Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής και Δ) Γραφιστική απεικόνιση της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε CD8⁺ T λεμφοκύτταρα παίνε ασθενών με ΣκΠ ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των IFN- γ ⁺ CD8⁺ λεμφοκυττάρων.

Επίδραση βέλτιστης δοσολογίας μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IFN- γ από κύτταρα ασθενών με SPMS έπειτα απο διέγερση με PMA/Ιονομυκίνη και IL-12/IL-18.

Παράλληλα με τους ασθενείς με RRMS διεξήχθησαν ενδεικτικά πειράματα και σε συλλεγμένα PBMCs από 2 ασθενείς με SPMS. Η επίδραση των τετρακυκλινών διερευνήθηκε στα κύτταρα αυτά κατά τον ίδιο τρόπο με των ασθενών με RRMS υπό θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα και όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.28** έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18 παρουσία δοσολογίας 50 μ g/ml τετρακυκλινών υπήρξε μείωση των IFN γ + NKT και IFN γ + CD4+ T λεμφοκυττάρων.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ IL-12 + IL-18

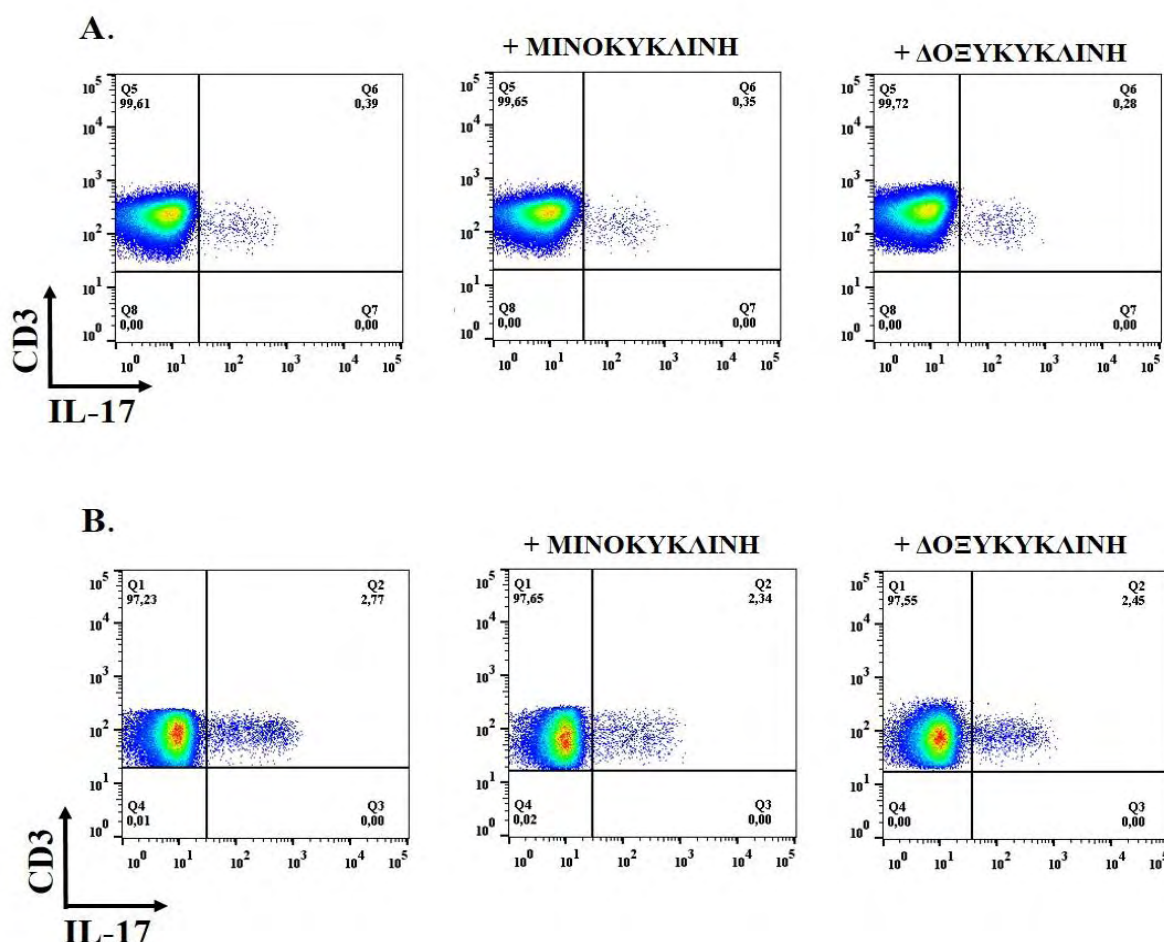


Εικόνα 12.28: Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής της επίδρασης μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στα 50 μ g/ml σε A) NKT και B) CD4+ T λεμφοκύτταρα SPMS ασθενών ενεργοποιημένα με IL-12 και IL-18. Παρατηρείται μείωση των IFN γ + NKT και IFN γ + CD4+ T λεμφοκυττάρων στην συγκεκριμένη δοσολογία και για τις δυο τετρακυκλίνες.

Επίδραση βέλτιστης δοσολογίας μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην παραγωγή IL-17 από κύτταρα από υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με RRMS έπειτα από διέγερση με PMA και ιονομυκίνη.

Μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από υγιείς μάρτυρες (n=5) και ασθενείς με RRMS υπό θεραπεία (n=5), ενεργοποιήθηκαν με τον συνδυασμό PMA και Ιονομυκίνης για 5 ώρες. Εκτός της επιτυχούς ανίχνευσης παραγωγής IFN γ ο συγκεκριμένος τρόπος διέγερσης επιτρέπει την ανίχνευση ικανοποιητικής παραγωγής IL-17 από τα CD3+CD4+ (Th17) λεμφοκύτταρα. Όσον αφορά την επίδραση των τετρακυκλινών στα λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες αλλά και από ασθενείς με RRMS όπως μπορεί να φανεί στην **Εικόνα 12.29** δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των IL-17+ CD3+CD4+ T κυττάρων υπό την παρουσία 50 μ g/ml μινοκυκλίνης ή δοξυκυκλίνης.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ PMA+ΙΟΝΟΜΥΚΙΝΗ



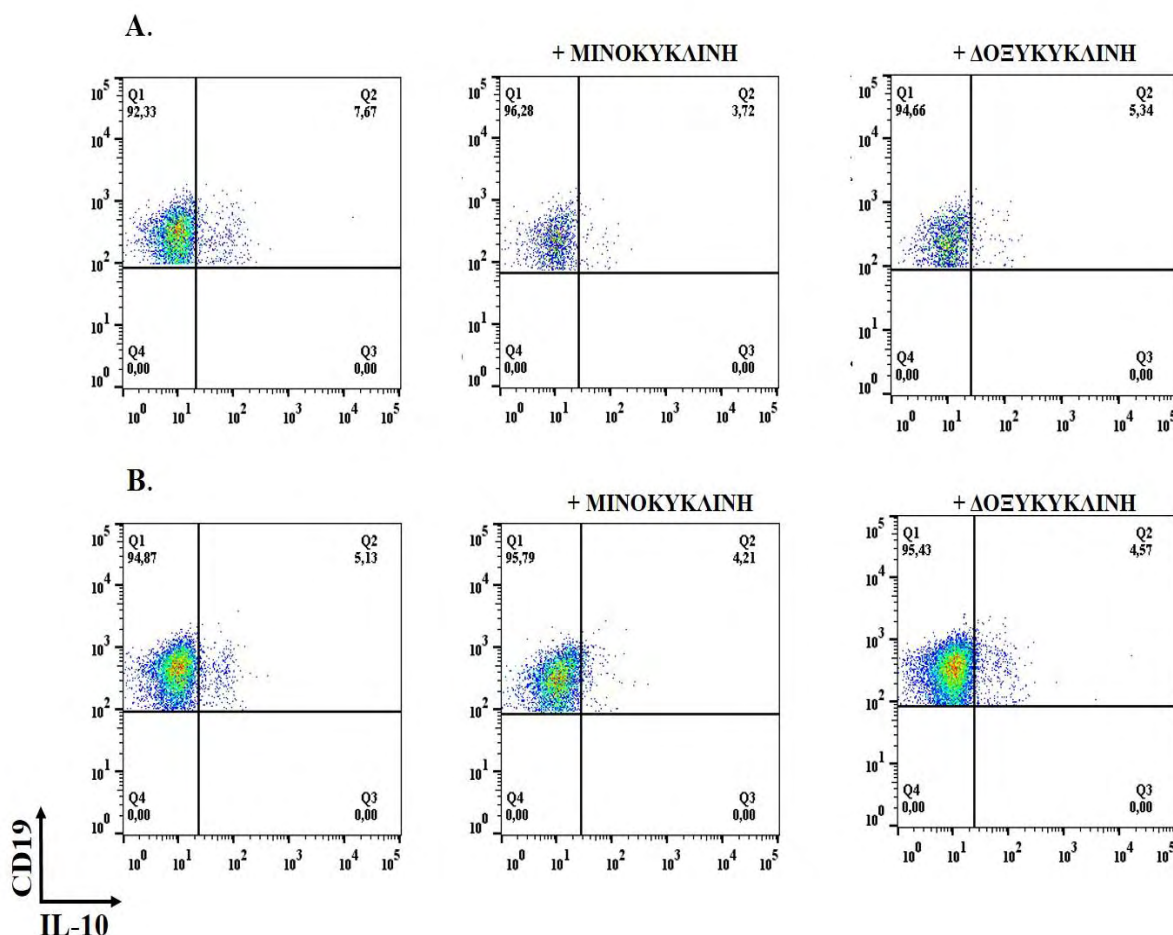
Εικόνα 12.29: Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50 μ g/ml σε A) CD4+ T λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες και B) ασθενών με RRMS όσον αφορά την παραγωγή IL17 έπειτα από ενεργοποίηση με PMA και Ιονομυκίνη. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των IL-17+ CD3+CD4+ T κυττάρων υπό την παρουσία 50 μ g/ml μινοκυκλίνης ή δοξυκυκλίνης.

Επίδραση μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην επαγωγή IL-10+ ρυθμιστικών B λεμφοκυττάρων (Bregs) σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με RRMS.

Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από υγιείς μάρτυρες (n=5) και ασθενείς με RRMS υπό θεραπεία (n=5), επώαστηκαν για 24ώρες με ODN2006 (διεγέρτη του TLR-9) παρουσία 50μg/ml τετρακυκλινών για να διερευνηθεί αν οι τετρακυκλίνες συμβάλουν στην επαγωγή ρυθμιστικών B κυττάρων (B10). Κατά την διάρκεια των τελευταίων 6 ωρών της επώασης, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με τον συνδυασμό PMA και Ιονομυκίνης παρουσία Brefeldin A ώστε να επιτευχθεί δέσμευση και ανίχνευση ενδοκυττάριας παραγωγής IL-10.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.30** κατά την επώαση των κυττάρων παρουσία των TCs δεν αυξήθηκε ο αριθμός των IL-10+ B κυττάρων αλλά αντίθετα φάνηκε να υπάρχει μείωση τους χωρίς ωστόσο αυτή να κρίνεται στατιστικά σημαντική.

ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΜΕ ODN2006 + PMA+ΙΟΝΟΜΥΚΙΝΗ

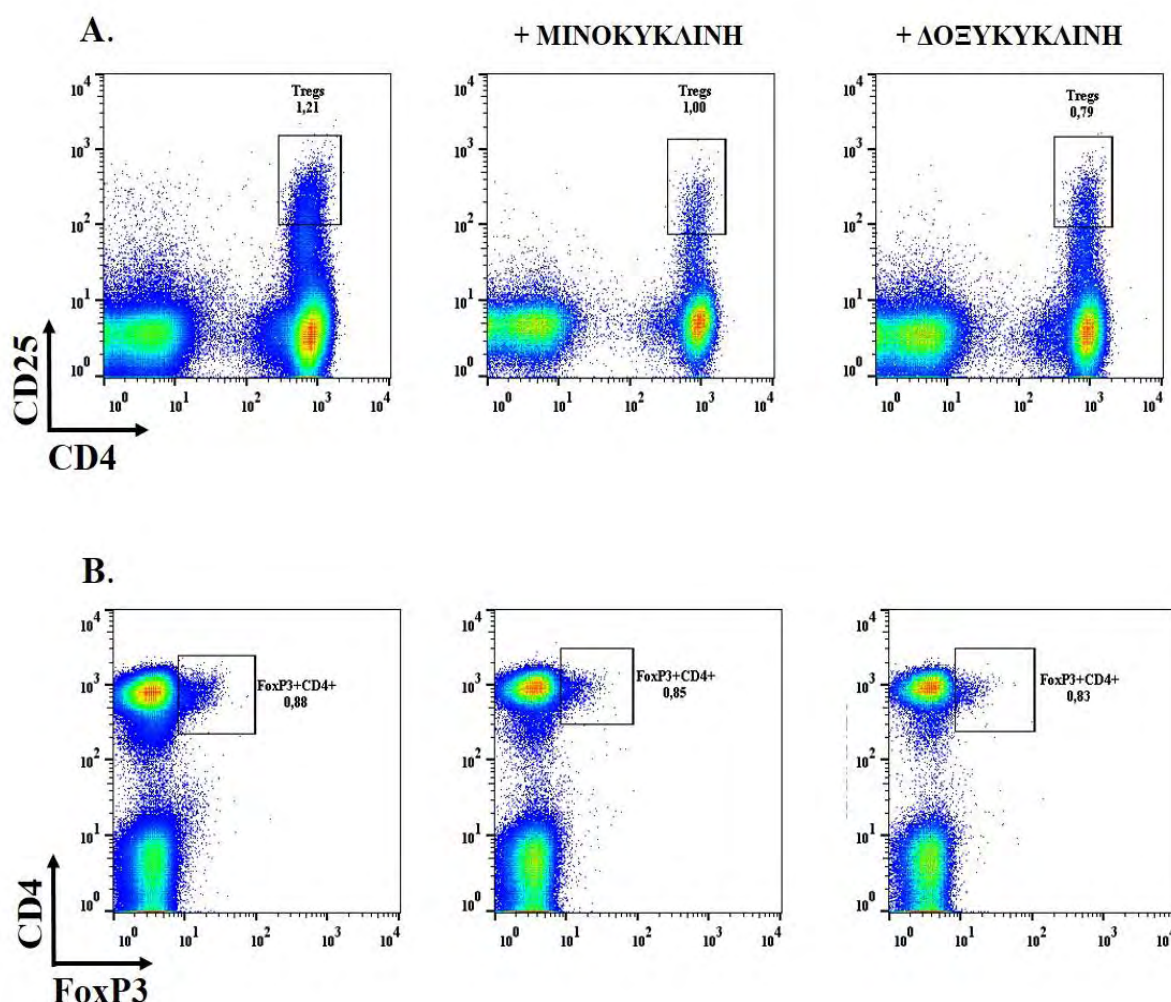


Εικόνα 12.30: Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50μg/ml σε B λεμφοκύτταρα από A) υγιείς μάρτυρες και B) ασθενείς με RRMS όσον αφορά την παραγωγή IL-10 έπειτα από επώαση με ODN2006 για 24 ώρες και ενεργοποίηση με PMA και Ιονομυκίνη.

Επίδραση μινοκυκλίνης και δοξυκυκλίνης στην επαγωγή CD4+CD25(high) και FoxP3+ ρυθμιστικών πληθυσμών (Tregs) σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με RRMS.

Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από υγιείς μάρτυρες (n=5) και ασθενείς με RRMS υπό θεραπεία (n=5), επώαστηκαν για 24ώρες παρουσία 50μg/ml τετρακυκλινών για να διερευνηθεί αν οι τετρακυκλίνες συμβάλουν στην επαγωγή ρυθμιστικών T κυττάρων (Tregs). Στη συνέχεια έγινε χρώση με συζευγμένα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των επιφανειακών υποδοχέων CD4 και CD25 όπως επίσης και ενδοκυττάρια ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην **Εικόνα 12.31** κατά την επώαση των κυττάρων παρουσία των TCs κατά την διάρκεια 24 ωρών δεν υπήρξε μεταβολή στα ποσοστά CD4+CD25(high) και CD4+FoxP3+ ρυθμιστικών T κυττάρων.



Εικόνα 12.31: Ενδεικτικές εικόνες κυτταρομετρίας ροής της επίδρασης τετρακυκλινών στα 50μg/ml σε CD4+ T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα από Α) υγιείς μάρτυρες και Β) ασθενείς με RRMS όσον αφορά την υψηλή έκφραση του CD25 και την ενδοκυττάρια ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα FoxP3.

13 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενεργοποίηση των προφλεγμονωδών κυτταρικών πληθυσμών είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της μετανάστευσης λευκοκυττάρων διαμέσου του ΑΕΦ και για την ακόλουθη φλεγμονή, απομυελίνωση και τον σχηματισμό πλακών, οι οποίες αποτελούν παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό της ΣκΠ (1). Φαρμακευτικοί παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν αυτούς τους προφλεγμονώδεις πληθυσμούς ή επιδρούν στους ρυθμιστικούς πληθυσμούς μπορούν να έχουν σημαντικό θεραπευτικό όφελος στην ΣκΠ (3). Παρότι οι μελέτες πάνω στην *in vitro* επίδραση TCs σε προφλεγμονώδεις και ρυθμιστικούς κυτταρικούς πληθυσμούς ασθενών με ΣκΠ είναι λίγες, η τεκμηριωμένη ανοσοτροποποιητική τους δράση (202, 229, 267) είναι άξια ερευνητικού ενδιαφέροντος.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε συγκριτικά για πρώτη φορά σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η *in vitro* ανοσοτροποποιητική επίδραση δύο TCs (της μιννοκυκλίνης και της δοξκυκλίνης) σε PBMCs ασθενών με ΣκΠ και υγιών μαρτύρων. Εκτός από την ταυτόχρονη αξιολόγηση της δράσης των δύο TCs, ώστε να επιτευχθεί συγκριτική ανάλυση τους, έγινε αξιολόγηση ποικίλων παραμέτρων. Αρχικά αξιολογήθηκε η ανοσοτροποποιητική επίδραση της μιννοκυκλίνης και της δοξκυκλίνης σε τέσσερις λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς (δύο πληθυσμούς εγγενούς ανοσίας τα NK και NKT λεμφοκύτταρα, και δύο πληθυσμούς επίκτητης ανοσίας τα CD4⁺ και τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα). Για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι διέγερσης λεμφοκυτταρικής ενεργοποίησης, μία μέσω μιτογόνου PMA και ιονομυκίνης και μία μέσω IL-12 και IL-18. Για πρώτη φορά, επίσης αξιολογήθηκε η επίδραση των δύο τετρακυκλινών στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών IFN- γ , IL-17 όπως επίσης και στην επαγωγή ρυθμιστικών πληθυσμών Tregs και Bregs. Όσον αφορά το κλινικό σκέλος, μελετήθηκαν 3 ομάδες ασθενών με ΣκΠ, RRMS ασθενείς υπό διαφορετική θεραπεία (n=10), SPMS ασθενείς χωρίς θεραπεία (n=2) και πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς χωρίς καμία θεραπεία (n=5). Σύμφωνα με τον συγκεκριμένο σχεδιασμό και λαμβάνοντας υπόψιν τις παραπάνω παραμέτρους, η ερευνητική μελέτη απέδωσε τα παρακάτω καινοτόμα δεδομένα και πορίσματα.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των δύο TCs στην παραγωγή IFN- γ από λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18. Όπως έχει αναφερθεί, οι IL-12/IL18 συνεργάζονται στην παραγωγή μέσω επαγωγής IFN- γ από T κύτταρα μέσω επαγωγής IL-18R στα T κύτταρα, αποτελώντας μια φυσιολογική οδό ανοσολογικής απόκρισης έναντι φλεγμονής. Η παρατηρούμενη επίδραση των δύο TCs στα PMBCs, όσον αφορά την παραγωγή IFN- γ ήταν η μείωση της και συμφωνεί με τα πορίσματα άλλων συγγραφέων (260). Και στις 3 ομάδες ασθενών η μεγαλύτερη επίδραση των TCs στην καταστολή της IFN- γ παρατηρήθηκε στον NKT λεμφοκυτταρικό πληθυσμό. Κατά φθίνουσα σειρά, η μείωση στην παραγωγή IFN- γ από τα NKT κύτταρα παρατηρήθηκε στους πρωτοδιαγνωσθέντες χωρίς θεραπεία, στους RRMS και τέλος

στους SPMS. Ας σημειωθεί ότι στην ομάδα των SPMS, ο αριθμός του δείγματος ήταν μικρός, μολονότι και στους δύο παρατηρήθηκε μείωση στην IFN- γ , περαιτέρω έρευνες με μεγαλύτερο αριθμό δείγματος πρέπει να πραγματοποιηθούν. Το γεγονός ότι την μεγαλύτερη μείωση στην παραγόμενη IFN- γ προερχόμενη από PBMCs εμφάνισαν οι πρωτοδιαγνωσθέντες με ΣκΠ ασθενείς (οι οποίοι εμφάνισαν και την μεγαλύτερη παραγωγή IFN- γ χωρίς την παρουσία TCs) μπορεί να αιτιολογηθεί από την διαφορετική έκφραση κυτταροκινών μεταξύ αυτών και των δύο άλλων ομάδων (RRMS, SPMS). Αν και οι μελέτες που αφορούν τα προφίλ έκφρασης κυτταροκινών στον ορό ασθενών με ΣκΠ είναι περιορισμένες και συχνά αντιφατικές, γνωρίζουμε ότι το επίπεδο έκφρασης mRNA γονιδίων όπως η IL-18, IL-1 β ρυθμίζεται προς τα άνω στα PBMCs ασθενών σε σχέση με υγιείς δότες (281). Διαφορετικό προφίλ κυτταροκινών ορού παρατηρείται μεταξύ πρωτοδιαγνωσθέντων με ΣκΠ και RRMS ασθενών, με τους πρώτους να παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IL-18, IL-12 / IL-23p40, IL-18, σύνδεσης IL-18 (IL-18BP) στον ορό τους (281). Ιδιαίτερα σημαντικό είναι επίσης το ότι οι TCs προκαλούν μείωση στην IFN- γ , παραγόμενη από τα NKT cells τόσο, μόνες τους όσο και σε συνδυασμό με την φαρμακευτική αγωγή των RRMS ασθενών (IFN- β 1, Copaxone, Tysabri). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τους Giuliani F. et. al., οι οποίοι σε ένα πειραματικό μοντέλο εγκεφαλομυελίτιδας παρατήρησαν *in vitro* συνεργική δράση μινोकυκλίνης και IFN- β 1 (257), αλλά και συνεργική δράση μινोकυκλίνης και οξικής γλατιμέρης (Copaxone) (256). Ο NKT λεμφοκυτταρικός πληθυσμός θεωρείται σήμερα η γέφυρα προσαρμοστικής (ειδικής) και έμφυτης ανοσίας. Πρόσφατα υποστηρίζεται ότι τα προερχόμενα από μυελίνη λιπιδικά αντιγόνα που καταστέλλουν ένα υπότυπο των NKT κυττάρων, τα iNKTs (invariant NKTs), μπορούν να δρουν ως κύτταρα-τελεστές στην καταστροφή της μυελίνης (282). Ανοσογόνα χαρακτηριστικά των λιπιδίων προερχόμενων από μυελίνη σε ΣκΠ περιλαμβάνουν εκτός από τον ρόλο των iNKTs ως κυττάρων-τελεστών και την μοριακή μίμηση (282). Το μοντέλο της μοριακής μίμησης για την ΣκΠ έχει μελετηθεί περισσότερο στον CD4+ λεμφοκυτταρικό πληθυσμό μέσω διασταυρούμενων αντιδραστικών επιτόπων ιών και του επιτόπου της MBP (283). Μια καλύτερη κατανόηση της μοριακής βάσης για την παρατηρούμενη απόκριση των iNKTs κατά την διάρκεια αυτοανοσίας του ΚΝΣ, απομένει να εξακριβωθεί αλλά σίγουρα πρέπει να αποτελεί έναν λεμφοκυτταρικό-πληθυσμό στόχο για την ΣκΠ.

Εκτός από τα NKTs, και οι δύο TCs επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τον CD4+ λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, αναστέλλοντας σημαντικά την *in vitro* παραγωγή της IFN- γ από αυτόν τον πληθυσμό, έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18 σε ασθενείς με ΣκΠ και υγιείς μάρτυρες. Στην παρούσα μελέτη τα CD4+ κύτταρα ήταν ο δεύτερος κυτταρικός πληθυσμός μετά τα NKTs που επηρεάστηκε περισσότερο από τις TCs. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την επίδραση των TCs τόσο στην εγγενή (NKT) όσο και στην προσαρμοστική-ειδική (CD4+) ανοσία. Και σε αυτήν την περίπτωση η δράση

των TCs επεκτάθηκε σε όλες τις ομάδες ασθενών καθώς και στους υγιείς δότες. Από τις ομάδες των ασθενών, εκείνη στην οποία παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση στην παραγωγή IFN- γ ήταν οι πρωτοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΣκΠ, χωρίς θεραπεία με τους RRMS να ακολουθούν. Παρά τις πολυάριθμες μελέτες που καταδεικνύουν τις κατασταλτικές επιδράσεις της μινουκυκλίνης στην ενεργοποίηση των CD4⁺ T κυττάρων, ένας ειδικός μηχανισμός δράσης παραμένει να διασαφηνιστεί. Οι Szeto G. et. al., πρότειναν ότι η μινουκυκλίνη αναστέλλει επιλεκτικά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της NFAT1, μέσω αυξημένης φωσφορύλωσης και μειωμένης πυρηνικής μετατόπισης του NFAT1 (284). Μάλιστα έδειξαν ότι η δόση των 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ in vitro είναι η βέλτιστη συγκέντρωση για την καταστολή της ενεργοποίησης των T κυττάρων με την πλήρη αναστολή της οδού NFAT να απαιτεί συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Ο NFAT ελέγχει την έκφραση πολλών προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IFN- γ , IL-4, IL-17. Συνεπώς η δράση της μινουκυκλίνης στην καταστολή της IFN- γ , μπορεί να αιτιολογηθεί με βάση αυτόν τον μηχανισμό και η δοσο-εξαρτώμενη φύση των ανοσοτροποποιητικών της ιδιοτήτων θα μπορούσε να εξισορροπηθεί σε ένα επιθυμητό σημείο αναφοράς με την παρακολούθηση της θεραπευτικής δόσης. Η δοξυκυκλίνη, όπως και η μινουκυκλίνη δύναται να επηρεάσει τον CD4⁺ λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, μέσω αναστολής της NF- κB οδού (285). Ο παράγοντας NF- κB ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική επιβίωση και στην κυτταρική απόκριση σε IFNs. Ο ρόλος των TCs στην απόπτωση και η δράση τους σε δύο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες (NFAT και NF- κB) πιθανόν αιτιολογούν την καταστολή IFN- γ που προκαλούν στον CD4⁺ λεμφοκυτταρικό πληθυσμό.

Όσον αφορά την επίδραση των TCs στον CD8⁺ λεμφοκυτταρικό πληθυσμό, ενώ οι υγιείς δότες εμφάνισαν στατιστικά σημαντική πτώση της IFN- γ έπειτα από διέγερση με IL-12/IL-18, και οι 3 ομάδες ασθενών δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική πτώση της IFN- γ . Το αποτέλεσμα μπορεί να δικαιολογηθεί από τον μικρό αριθμό δείγματος αλλά και στην διαφορετική δυναμική του κάθε λεμφοκυτταρικού πληθυσμού.

Ενδιαφέρον είναι ότι στα NK λεμφοκύτταρα σε αντίθεση με τα NKT δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση κανενός εκ των δύο TCs στην παραγωγή IFN- γ έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18. Το γεγονός αυτό είναι αρκετά παράδοξο, διότι τα NK αποτελούν μαζί με τα NKT τους βασικούς λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που εκφράζουν εγγενώς υποδοχείς για την IL-12 και IL-18 και απαντούν με γρήγορη παραγωγή IFN- γ σε ανάλογη διέγερση. Επίσης είναι ο κύριος λεμφοκυτταρικός στόχος παραγωγής IFN- γ μαζί με τα T κύτταρα στους ασθενείς με RRMS (171). Παρότι μετά από διέγερση με IL-12, IL-18, τόσο τα NK κύτταρα από υγιείς μάρτυρες όσο και από ασθενείς με RRMS είχαν σημαντική έκφραση της IFN- γ , η τελευταία δεν μειώθηκε στατιστικά σημαντικά παρουσία TCs στην συγκέντρωση των 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι στο πείραμα των δόσεων έναντι απόκρισης (dose response, **Εικόνα 12.11**), η

επίδραση της μιννοκυκλίνης οδήγησε σε μείωση των IFN- γ + NK από 19% στην δόση 0.1 μ g/ml έως 34% στην δόση 50 μ g/ml και η επίδραση της δοξυκυκλίνης σε μείωση των IFN- γ + NK κυττάρων από 10% στην δόση 0.1 μ g/ml έως 26% στην δόση 50 μ g/ml. Τα πιθανά αίτια για την έλλειψη επίδρασης των TCs στην παραγωγή IFN- γ από τα NK κύτταρα μπορούν να αναζητηθούν στις βασικές διαφορές μεταξύ των NKT και NK κυττάρων όσον αφορά τους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν στην επαγωγή της IFN- γ . Πιο συγκεκριμένα και οι δύο πληθυσμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρώιμη έκφραση IFN- γ μέσω διέγερσης με IL-12 και IL-18. Ωστόσο όσον αφορά τα NKT, η ελάχιστη διέγερση του υποδοχέα T κυττάρου (TCR) επάγει την ακετυλίωση της ιστόνης H4 σε ειδικές περιοχές κοντά στον τόπο του IFN- γ γονιδίου (gene locus) (286). Αυτό καθιστά τα κύτταρα NKT ικανά να παράγουν IFN- γ με έμφυτο τρόπο (δηλαδή χωρίς να απαιτείται ταυτόχρονη διέγερση με TCR) κατά την έκθεση σε IL-12 και IL-18 (287). Η μιννοκυκλίνη έχειδειχθεί ότι μπορεί να αναστείλει την ακετυλίωση των ιστόνων σε κάποια κύτταρα και αυτή είναι μια νέα λειτουργία που μπορεί να συμβάλει στην ανοσοτροποποιητική επίδραση των TCs. Από την άλλη πλευρά όσον αφορά τα NK κύτταρα, το μόριο της I κ B ζ είναι απολύτως αναγκαίο για την παραγωγή IFN- γ και την κυτταροτοξική τους δράση έπειτα από διέγερση με IL-12 και IL-18 (288). Η έκφραση της I κ B ζ είναι αποτέλεσμα άμεσης απόκρισης της παρουσίας IL-18 σε κύτταρα NK, αλλά όχι σε T κύτταρα, οπότε είναι πιθανό οι TCs να μην έχουν κάποια επίδραση στην I κ B ζ και επομένως να μην μπορούν να καταστείλουν την IFN- γ στα NK κύτταρα. Εκτός της I κ B ζ αρκετά άλλα μόρια στόχοι σημαντικών σηματοδοτικών οδών που συμμετέχουν στην ρύθμιση της IFN γ στα NK κύτταρα, όπως τα p38 MAPK και STAT-4, μπορούν δυνητικά να διερευνηθούν όσον αφορά την πιθανή ή όχι καταστολή τους παρουσία TCs. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί το γεγονός της αλληλεπίδρασης NK κυττάρων με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς όπως τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκκριση IFN- γ έπειτα από διέγερση με IL-12/IL-18 (289). Η μιννοκυκλίνη έχει τεκμηριωθεί ότι ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση του NF- κ B και ενισχύει την αντιμικροβιακή δράση έναντι του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (*Staphylococcus aureus*) σε μεσεγχυματικά-στρωματικά / βλαστοκύτταρα (290). Η αλληλεπίδραση των TCs με τα NK αλλά και τα NKT αξίζει να διερευνηθεί εκτενέστερα καθώς τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που εκκρίνουν IFN- β συνδυασμένα με μιννοκυκλίνη έχειδειχθεί ότι έχουν κατασταλτικό ρόλο στην EAE (291).

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούν την επίδραση των TCs στην παραγωγή IFN- γ από PBMCs, μετά από διέγερση με IL-12/IL-18. Στην παρούσα μελέτη έγινε όμως και ενεργοποίηση κυττάρων με την χημική ουσία phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) σε συνδυασμό με Ιονομυκίνη. Μεταξύ των δύο μεθόδων ενεργοποίησης υπήρξαν διαφορές τόσο στην ποσοστιαία παραγωγή IFN- γ , όσο κι στην απόκριση παρουσία των TCs. Όσον αφορά την δυναμικότητα εκφράσεως της IFN- γ , ο συνδυασμός PMA με Ιονομυκίνη αποτελεί έναν ευρύ (καθώς διεγείρει

ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια και μόρια όπως της PKC και του NFAT), αλλά και έναν γρήγορο τρόπο (εντός 5 ωρών) παραγωγής και ανίχνευσης IFN- γ από αρκετούς λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς εντός των PBMCs. Σε αντίθεση με την διέγερση μέσω IL-12/IL-18, όπου οι δύο TCs παρουσίαζαν παρόμοια δράση όσον αφορά την μείωση της IFN- γ , στη διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά διαφορές στην επίδραση μεταξύ τους. Ειδικότερα όσον αφορά τον NKT λεμφοκυτταρικό πληθυσμό υγιών μαρτύρων υπήρξε μείωση στην παραγωγή IFN- γ παρουσία δοξυκυκλίνης αλλά όχι παρουσία μινोκυκλίνης (**Εικόνα 12.8**). Αυτό το φαινόμενο ήταν ακόμη πιο εμφανές στον NKT λεμφοκυτταρικό πληθυσμό RRMS ασθενών. Συγκεκριμένα ενώ στους υγιείς παρουσία δοξυκυκλίνης, υπήρχε μία μείωση κατά 52% στην δόση των 50 $\mu\text{g/ml}$, στους RRMS η μείωση αυτή ήταν 78.1% στην ίδια δόση. Ωστόσο εκτός των NKT κυττάρων με την μέθοδο διέγερσης PMA/IONO δεν είδαμε καμία άλλη σημαντική μεταβολή στους υπόλοιπους κυτταρικούς υποπληθυσμούς, συνεπώς τα πειράματα της παρούσας μελέτης επικεντρώθηκαν στην διέγερση μέσω IL-12/IL-18. Μέσω του διεγερτικού μηχανισμού της Ιονομυκίνης, ήταν αναμενόμενη η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού μέσω ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}), της καλσινευρίνης και του μεταγραφικού παράγοντα NFAT. Εξίσου αναμενόμενη ήταν παρουσία μινοκυκλίνης η αναστολή του NFAT και η κατ' επέκταση μείωση της IFN- γ . Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι δεν διαπιστώθηκε καταστολή παρουσία μινοκυκλίνης σε κανένα κυτταρικό πληθυσμό πιθανώς λόγω της ισχυρότητας της διέγερσης και της μεγάλης παραγωγής IFN- γ . Εκτός αυτού, σίγουρα καινοτόμο πόρισμα της μελέτης είναι το γεγονός ότι η δοξυκυκλίνη είχε ανασταλτική δράση στην παραγωγή IFN- γ στα NKT. Η δράση αυτή της δοξυκυκλίνης μπορεί να σημαίνει ότι εκτός του NF- κB δύναται να επηρεάζει και την PKC και τον NFAT, δύο βασικά μόρια που διεγείρονται μέσω του PMA και της Ιονομυκίνης.

Εκτός του ποσοτικού προσδιορισμού IFN- γ υπό την επίδραση TCs, μελετήθηκε παράλληλα και ο κυτταρικός πληθυσμός Th17. Τα κύτταρα Th17 παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην αυτοάνοση φλεγμονή του ΚΝΣ, κυρίως στις αρχικές φάσεις της νόσου. Η έκκριση του GM-CSF από Th17 κύτταρα φαίνεται να διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση κυττάρων του ΚΝΣ (μικρογλοία, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα), καθώς κύτταρα Th17 με ανεπάρκεια GM-CSF αδυνατούν να προκαλέσουν EAE (134). Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο τρόπος διέγερσης με PMA και Ιονομυκίνη για την διερεύνηση της επίδρασης των TCs στην έκφραση της IL-17A από τα CD4^{+} T λεμφοκύτταρα (Th17 cells) σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με ΣκΠ. Διέγερση με PMA και Ιονομυκίνη οδηγεί σε λίγη, αλλά αρκετά καλά ανιχνεύσιμη με κυτταρομετρία ροής IL-17A. Σε ενδεικτικά αποτελέσματα η IL-17A στους υγιείς μάρτυρες κυμαινόταν στο 0.5% από τα CD4^{+} T κύτταρα, ενώ στους ασθενείς με ΣκΠ ήταν πάνω από 2-2.5 %. Στα πειράματα που διεξήχθησαν, οι TCs δεν μείωσαν την IL-17A στις 5 ώρες διέγερσης με PMA/IONO. Κάποιες ενδείξεις όσον αφορά τον ρόλο των TCs έχουμε από την βιβλιογραφία στο μοντέλο της EAE. Η

μινοκυκλίνη, χορηγούμενη για δύο εβδομάδες μετά την κλινική έναρξη, μείωσε σημαντικά τις συσσωρευτικές και τις μέσες κλινικές βαθμολογίες της EAE. Αυτό συσχετίστηκε με τη μείωση τόσο των CD4+ όσο και των CD8+ T κυττάρων στον νωτιαίο μυελό χωρίς να επηρεάζεται το προφίλ παραγωγής κυτταροκινών. Η κυρίαρχη κυτταροκίνη που παράχθηκε από τα T κύτταρα στην σπλήνα ήταν η IFN-γ, ενώ στο ΚΝΣ ήταν η IL-17 (292). Από την άλλη πλευρά η δοξυκυκλίνη στην πειραματική αυτοάνοση νευρίτιδα, που είναι μια αυτοάνοση φλεγμονώδης απομυελινωτική ασθένεια του περιφερικού νευρικού συστήματος με τη μεσολάβηση των T κυττάρων, εξασθένησε σημαντικά τη σοβαρότητα της. Πιο συγκεκριμένα μείωσε τη φλεγμονώδη διείσδυση των μακροφάγων, των B- και T-κύτταρων και την απομυελίνωση στα ισχιακά νεύρα των αρουραίων. Τα προφλεγμονώδη μόρια συμπεριλαμβανομένης της MMP-9, της επαγωγίσιμης συνθάσης νιτρικού οξειδίου και της IL-17 μειώθηκαν σημαντικά στα ισχιακά νεύρα έπειτα από την χορήγηση δοξυκυκλίνης (293). Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι είναι αποδεδειγμένη η δράση της δοξυκυκλίνης στην αύξηση παραγωγής GM-CSF και IL-6 στα θυρεοειδή επιθηλιακά κύτταρα (TECs) που αποτελούν ένα κύριο συστατικό του θυμικού στρώματος το οποίο παρέχει ένα μικροπεριβάλλον κρίσιμο για την ανάπτυξη θυμοκυττάρων και κατ' επέκταση T λεμφοκυττάρων (294).

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ανέδειξαν την ύπαρξη κυτταρο-εξαρτώμενης (cell specific) επίδρασης των TCs όσον αφορά την παραγωγή IFN-γ από τους κυτταρικούς πληθυσμούς των NKT, CD4+ T και CD8+ T αλλά όχι των NK λεμφοκυττάρων. Αντίθετα δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια επίδραση στην παραγωγή IL-17A από τα Th17. Αυτό το πόρισμα συνηγορεί στην πιθανή δράση των TCs περισσότερο ως αναστολείς ενδοκυτταρικών μηχανισμών καθώς υπήρξε ταχεία και σημαντική μείωση της IFN-γ εντός 5 ωρών παρουσία TCs και λιγότερο ως επαγωγείς κατασταλτικών-ρυθμιστικών κυττάρων που να παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως την IL-10. Αν ίσχυε η τελευταία περίπτωση θα αναμενόταν η μείωση της IL-17 στα CD4+ T κύτταρα όπως επίσης και η ελάττωση της IFN-γ από τα NK κύτταρα λόγω της αύξησης της παραγόμενης IL-10 και TGF-β από ρυθμιστικούς πληθυσμούς (295). Επίσης ο σύντομος χρόνος επώασης και δράσης των TCs (5 ώρες) είναι αμφίβολο αν θα επαρκούσε για την επαγωγή ρυθμιστικών κυττάρων. Μέσα από την βιβλιογραφία ωστόσο υπήρχαν κάποιες αναφορές όσον αφορά την έμμεση επαγωγή Tregs από τις TCs που αφορούσαν την επίδραση στα δένδριτικά κύτταρα και την περαιτέρω αύξηση των Tregs (296). Ειδικότερα, δένδριτικά κύτταρα παρουσία μινοκυκλίνης (Mino-DC) παρουσίασαν μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης αντιγονο-ειδικών κύτταρων T, ενώ αύξησαν τον πολλαπλασιασμό ρυθμιστικών κυττάρων CD4+ CD25+ Foxp3+ T τόσο in vitro όσο και in vivo. Επιπλέον παρουσία Mog35-55 πεπτιδίων τα Mino-DCs βελτιώσαν κλινικές παραμέτρους στο μοντέλο της EAE. Όλα αυτά οδήγησαν στην ερευνητική υπόθεση ότι οι TCs έχουν την δυνατότητα να επάγουν

ρυθμιστικούς πληθυσμούς Tregs και Bregs, οπότε διενεργήθηκαν ενδεικτικά πειράματα παρουσία TCs για 24 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη των Tregs μέσω φαινοτυπικής ανάλυσης επιφανειακών επιτόπων CD4⁺ και CD25⁺ και ενδοκυττάριας ανίχνευσης του ειδικού μεταγραφικού παράγοντα FoxP3. Στις 24 ώρες παρουσία TCs δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στον αριθμό των Tregs κυττάρων τόσο στους υγιείς όσο και στους RRMS ασθενείς. Είναι πιθανόν να χρειάζονται μεγαλύτερες χρονικά επώσεις παρουσία των αντιβιοτικών για την ανάδειξη και την επαγωγή ρυθμιστικών T κυττάρων οι οποίες θα προσέθεταν και άλλες παραμέτρους που θα έκαναν πολύπλοκη την διερεύνηση της επίδρασης των TCs, όπως για παράδειγμα η απαραίτητη παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων της IL-2 (297). Επίσης διερευνήθηκε η πιθανή επαγωγή Bregs κυττάρων μέσω 24ωρης επώσεως παρουσία TCs. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε διέγερση με ODN2006 (CpG rich motifs) που ενεργοποιεί τον υποδοχέα TLR-9 στα B κύτταρα και επαγωγή IL-10. Παρουσία TCs παρατηρήθηκε μείωση της IL-10 από τα B λεμφοκύτταρα. Αυτό συμφωνεί με παλαιότερες μελέτες στην βιβλιογραφία που δείχνουν ότι οι TCs αναστέλλουν σημαντικές λειτουργίες των διεγερθέντων B λεμφοκυττάρων (298).

Παρότι η δοξκυκλίνη και η μινोकυκλίνη έχουν ερευνηθεί και δοκιμαστεί κλινικά σε διάφορες παθήσεις αυτοάνοσης και φλεγμονώδους αιτιολογίας (Πίνακας 9.4.2), η τελευταία μόνο έχει δοκιμαστεί κλινικά σε ασθενείς με ΣκΠ (Πίνακας 9.5.1). Στην παρούσα μελέτη όμως, απεδείχθη η αδιαμφισβήτητη υπεροχή της δοξκυκλίνης στην ίδια δόση με την μινोकυκλίνη, όσον αφορά την επίδρασή της σε προφλεγμονώδεις πληθυσμούς ασθενών με ΣκΠ. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι η δοξκυκλίνη παρουσιάζει λιγότερο σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες, σε αντίθεση με την μινोकυκλίνη, την καθιστά καλύτερο ερευνητικό στόχο για την ΣκΠ. Ο λόγος για τον οποίο αυτή η ισόποση δόση δοξκυκλίνης μπορεί να προκαλεί ισχυρότερα αποτελέσματα σχετίζεται πιθανώς με την ειδική συμμετοχή χαμηλότερων δόσεων δοξκυκλίνης σε φλεγμονώδεις μηχανισμούς. Η μινोकυκλίνη από την άλλη εμφανίζει το πλεονέκτημα της ευκολότερης ιστικής κατανομής στον εγκέφαλο δια μέσου του ΑΕΦ. Πιθανός υψηλότερες in vitro συγκεντρώσεις της μινोकυκλίνης να παρουσιάζουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα της δοξκυκλίνης. Και οι δύο TCs πάντως, φάνηκε ότι δρύνε δοσο-εξαρτώμενα και κυτταρο-εξαρτώμενα, πιθανώς μέσω ενδοκυττάρων διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Περισσότερες έρευνες πρέπει ωστόσο να πραγματοποιηθούν, διότι υπάρχουν δύο σημαντικές επιφυλάξεις που πρέπει να εξεταστούν. Πρώτον είναι δύσκολο να συσχετιστούν in vitro συγκεντρώσεις με τα επίπεδα των TCs στον ορό κατά τη διάρκεια της συνήθους δόσης από το στόμα και δεύτερον είναι δύσκολο να συσχετιστούν οι συγκεντρώσεις και τα επίπεδα των TCs στον ορό με συγκεντρώσεις σε όργανα όπως ο εγκέφαλος ή τα δευτερεύοντα λεμφοειδή όργανα.

Συνοψίζοντας η μελέτη μας υποδεικνύει ότι η μινοκυκλίνη και η δοξυκυκλίνη επιδρούν στους προφλεγμονώδεις αλλά όχι στους ρυθμιστικούς κυτταρικούς πληθυσμών ασθενών με ΣκΠ, καταστέλλοντας την παραγωγή IFN- γ , μόνες τους ή συνδυαστικά με άλλες φαρμακευτικές αγωγές κυρίως στον NKT λεμφοκυτταρικό πληθυσμό. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτη με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, οφείλει να διερευνήσει τον τρόπο με τον οποίο οι δύο τετρακυκλίνες εμφανίζουν αυτήν την δράση και να εγγυηθεί την αποτελεσματικότητά τους ως θεραπευτικό μέσο στην ΣκΠ.

14 ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J*. 2017;19(1):1-10.
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502-17.
3. Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou ME, de Courten M, Matsoukas J, et al. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sci*. 2017;7(7).
4. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121-7.
5. Rejdak K, Jackson S, Giovannoni G. Multiple sclerosis: a practical overview for clinicians. *Br Med Bull*. 2010;95:79-104.
6. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol*. 2006;5(4):343-54.
7. Tremlett H, Zhao Y, Rieckmann P, Hutchinson M. New perspectives in the natural history of multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(24):2004-15.
8. Ontaneda D, Fox RJ. Progressive multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2015;28(3):237-43.
9. Bradl M, Lassmann H. Progressive multiple sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009;31(4):455-65.
10. Glad S, Nyland H, Myhr KM. Benign multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2006;183:55-7.
11. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359(9313):1221-31.
12. Koutsouraki E, Costa V, Baloyannis S. Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: a review. *Int Rev Psychiatry*. 2010;22(1):2-13.
13. Dilokthornsakul P, Valuck RJ, Nair KV, Corboy JR, Allen RR, Campbell JD. Multiple sclerosis prevalence in the United States commercially insured population. *Neurology*. 2016;86(11):1014-21.
14. Papathanasopoulos P, Gourzoulidou E, Messinis L, Georgiou V, Leotsinidis M. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in western Greece: a 23-year survey. *Neuroepidemiology*. 2008;30(3):167-73.
15. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. Why does the north-south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the northern hemisphere? *J Neurol Sci*. 2011;311(1-2):58-63.

16. Beretich BD, Beretich TM. Explaining multiple sclerosis prevalence by ultraviolet exposure: a geospatial analysis. *Mult Scler*. 2009;15(8):891-8.
17. Zivadinov R, Iona L, Monti-Bragadin L, Bosco A, Jurjevic A, Taus C, et al. The use of standardized incidence and prevalence rates in epidemiological studies on multiple sclerosis. A meta-analysis study. *Neuroepidemiology*. 2003;22(1):65-74.
18. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol*. 2007;254(4):471-7.
19. Bronnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Stenager E. Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain*. 2004;127(Pt 4):844-50.
20. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J*. 1971;3(5777):725-9.
21. Bianchini E, De Biasi S, Simone AM, Ferraro D, Sola P, Cossarizza A, et al. Invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Immunol Lett*. 2017;183:1-7.
22. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*. 2016;36(2):115-27.
23. Bando Y. Myelin morphology and axon pathology in demyelination during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neural Regen Res*. 2015;10(10):1584-5.
24. Morell P, Jurevics H. Origin of cholesterol in myelin. *Neurochem Res*. 1996;21(4):463-70.
25. Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015;63(6):435-49.
26. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;338(5):278-85.
27. Haines JD, Inglese M, Casaccia P. Axonal damage in multiple sclerosis. *Mt Sinai J Med*. 2011;78(2):231-43.
28. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(4):225-38.
29. Sorbara CD, Wagner NE, Ladwig A, Nikic I, Merkler D, Kleele T, et al. Pervasive axonal transport deficits in multiple sclerosis models. *Neuron*. 2014;84(6):1183-90.
30. Ciccarelli O, Barkhof F, Bodini B, De Stefano N, Golay X, Nicolay K, et al. Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. *Lancet Neurol*. 2014;13(8):807-22.
31. Mirshafiey A, Jadidi-Niaragh F. Prostaglandins in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010;32(4):543-54.

32. Weisssert R. The immune pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(4):857-66.
33. Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology.* 2012;78(11):823-32.
34. Kasper LH, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology.* 2010;74 Suppl 1:S2-8.
35. Farjam M, Zhang GX, Ciric B, Rostami A. Emerging immunopharmacological targets in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2015;358(1-2):22-30.
36. van Nierop GP, van Luijn MM, Michels SS, Melief MJ, Janssen M, Langerak AW, et al. Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol.* 2017;134(3):383-401.
37. Shi Y, Feng Y, Kang J, Liu C, Li Z, Li D, et al. Critical regulation of CD4+ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nat Immunol.* 2007;8(8):817-24.
38. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000;343(13):938-52.
39. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:185-217.
40. Calabrese M, Filippi M, Gallo P. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(8):438-44.
41. Filippi M, Rocca MA, Barkhof F, Bruck W, Chen JT, Comi G, et al. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2012;11(4):349-60.
42. Lassmann H. The pathology of multiple sclerosis and its evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999;354(1390):1635-40.
43. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneap Minn).* 2013;19(4 Multiple Sclerosis):901-21.
44. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000;47(6):707-17.
45. Fagnani C, Neale MC, Nistico L, Stazi MA, Ricigliano VA, Buscarinu MC, et al. Twin studies in multiple sclerosis: A meta-estimation of heritability and environmentality. *Mult Scler.* 2015;21(11):1404-13.
46. Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens.* 1972;2(1):1-4.

47. Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, et al. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet.* 1996;13(4):464-8.
48. Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2007;165(10):1097-109.
49. Haegert DG, Muntoni F, Murru MR, Costa G, Francis GS, Marrosu MG. HLA-DQA1 and -DQB1 associations with multiple sclerosis in Sardinia and French Canada: evidence for immunogenetically distinct patient groups. *Neurology.* 1993;43(3 Pt 1):548-52.
50. Wang JH, Pappas D, De Jager PL, Pelletier D, de Bakker PI, Kappos L, et al. Modeling the cumulative genetic risk for multiple sclerosis from genome-wide association data. *Genome Med.* 2011;3(1):3.
51. Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Semin Immunol.* 2009;21(6):328-33.
52. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature.* 1995;377(6545):150-1.
53. Sadovnick AD, Risch NJ, Ebers GC. Canadian collaborative project on genetic susceptibility to MS, phase 2: rationale and method. Canadian Collaborative Study Group. *Can J Neurol Sci.* 1998;25(3):216-21.
54. Dyment DA, Yee IM, Ebers GC, Sadovnick AD, Canadian Collaborative Study G. Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77(2):258-9.
55. Islam T, Gauderman WJ, Cozen W, Hamilton AS, Burnett ME, Mack TM. Differential twin concordance for multiple sclerosis by latitude of birthplace. *Ann Neurol.* 2006;60(1):56-64.
56. O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA. Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology.* 2013;40(1):1-12.
57. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2004;3(2):104-10.
58. Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A, Olsen A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands. 5. The occurrence of the fourth epidemic as validation of transmission. *Acta Neurol Scand.* 1993;88(3):161-73.
59. Poskanzer DC, Prenney LB, Sheridan JL, Kondy JY. Multiple sclerosis in the Orkney and Shetland Islands. I: Epidemiology, clinical factors, and methodology. *J Epidemiol Community Health.* 1980;34(4):229-39.

60. Haahr S, Koch-Henriksen N, Moller-Larsen A, Eriksen LS, Andersen HM. Increased risk of multiple sclerosis after late Epstein-Barr virus infection: a historical prospective study. *Mult Scler.* 1995;1(2):73-7.
61. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenberger P, Wagner H, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology.* 2000;55(2):178-84.
62. Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'Ambrosia J M, Ludwin SK, et al. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis.* 2003;187(9):1377-87.
63. Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, et al. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1999;46(1):6-14.
64. Swank RL, Lerstad O, Strom A, Backer J. Multiple sclerosis in rural Norway its geographic and occupational incidence in relation to nutrition. *N Engl J Med.* 1952;246(19):722-8.
65. Goldberg P, Fleming MC, Picard EH. Multiple sclerosis: decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Med Hypotheses.* 1986;21(2):193-200.
66. Salzer J, Hallmans G, Nystrom M, Stenlund H, Wadell G, Sundstrom P. Vitamin D as a protective factor in multiple sclerosis. *Neurology.* 2012;79(21):2140-5.
67. Kimball SM, Ursell MR, O'Connor P, Vieth R. Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(3):645-51.
68. Briones-Buixassa L, Mila R, J MfA, Bufill E, Olaya B, Arrufat FX. Stress and multiple sclerosis: A systematic review considering potential moderating and mediating factors and methods of assessing stress. *Health Psychol Open.* 2015;2(2):2055102915612271.
69. Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. *P T.* 2012;37(3):175-84.
70. Hauser SL GD. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. II ed. New York: McGraw-Hill Medical 2008.
71. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet.* 2017;389(10076):1336-46.
72. Taylor RS. Multiple sclerosis potpourri. Paroxysmal symptoms, seizures, fatigue, pregnancy, and more. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 1998;9(3):551-9, vi.
73. Cree BAC. CURRENT Diagnosis & Treatment Neurology. 2nd ed 2007.
74. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69(2):292-302.

75. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol.* 2016;15(3):292-303.
76. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-73.
77. Traboulsee A, Simon JH, Stone L, Fisher E, Jones DE, Malhotra A, et al. Revised Recommendations of the Consortium of MS Centers Task Force for a Standardized MRI Protocol and Clinical Guidelines for the Diagnosis and Follow-Up of Multiple Sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2016;37(3):394-401.
78. Rovira A, Wattjes MP, Tintore M, Tur C, Yousry TA, Sormani MP, et al. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis-clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(8):471-82.
79. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol.* 2005;62(6):865-70.
80. Fuhr P, Kappos L. Evoked potentials for evaluation of multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2001;112(12):2185-9.
81. Lublin F. Multiple sclerosis trial designs for the 21st century: building on recent lessons. *J Neurol.* 2005;252 Suppl 5:v46-53.
82. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74 Suppl 1:S17-24.
83. Zang Y, Hong J, Robinson R, Li S, Rivera VM, Zhang JZ. Immune regulatory properties and interactions of copolymer-I and beta-interferon 1a in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003;137(1-2):144-53.
84. Torkildsen O, Myhr KM, Bo L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *Eur J Neurol.* 2016;23 Suppl 1:18-27.
85. Dhib-Jalbut S. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology.* 2002;58(8 Suppl 4):S3-9.
86. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74 Suppl 1:S25-30.
87. Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Pecht I, Arnon R, Sela M. Binding of copolymer 1 and myelin basic protein leads to clustering of class II MHC molecules on antigen-presenting cells. *Int Immunol.* 1997;9(7):925-34.
88. Martinelli Boneschi F, Rovaris M, Johnson KP, Miller A, Wolinsky JS, Ladkani D, et al. Effects of glatiramer acetate on relapse rate and accumulated disability in multiple sclerosis: meta-

analysis of three double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trials. *Mult Scler.* 2003;9(4):349-55.

89. Mancardi GL, Sardanelli F, Parodi RC, Melani E, Capello E, Inglese M, et al. Effect of copolymer-1 on serial gadolinium-enhanced MRI in relapsing remitting multiple sclerosis. *Neurology.* 1998;50(4):1127-33.

90. Minagar A. Current and future therapies for multiple sclerosis. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:249101.

91. Blumenfeld S, Staun-Ram E, Miller A. Fingolimod therapy modulates circulating B cell composition, increases B regulatory subsets and production of IL-10 and TGFbeta in patients with Multiple Sclerosis. *J Autoimmun.* 2016;70:40-51.

92. Piancone F, Saresella M, Marventano I, La Rosa F, Zoppis M, Agostini S, et al. B Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Bregs and BTLA/CD272 Expressing-CD19+ Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Sci Rep.* 2016;6:29699.

93. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;362(5):402-15.

94. Lee DH, Linker RA, Gold R. Spotlight on fumarates. *Int MS J.* 2008;15(1):12-8.

95. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(12):1098-107.

96. Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet.* 2008;372(9648):1463-72.

97. Killestein J, Rudick RA, Polman CH. Oral treatment for multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2011;10(11):1026-34.

98. Claussen MC, Korn T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. *Clin Immunol.* 2012;142(1):49-56.

99. Ochoa-Reparaz J, Colpitts SL, Kircher C, Kasper EJ, Telesford KM, Begum-Haque S, et al. Induction of gut regulatory CD39(+) T cells by teriflunomide protects against EAE. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3(6):e291.

100. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2003;348(1):15-23.

101. Kappos L, Bates D, Hartung HP, Havrdova E, Miller D, Polman CH, et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol.* 2007;6(5):431-41.

102. Putzki N, Yaldizli O, Buhler R, Schwegler G, Curtius D, Tettenborn B. Natalizumab reduces clinical and MRI activity in multiple sclerosis patients with high disease activity: results from a multicenter study in Switzerland. *Eur Neurol.* 2010;63(2):101-6.
103. Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, Chaudhuri A, Forbes R, Hawkins CP, et al. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology.* 1999;53(3):466-72.
104. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354(9):899-910.
105. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354(9):911-23.
106. Mercanti DJ, Rousseau GM, Capra ML, Quiberoni A, Tremblay DM, Labrie SJ, et al. Genomic Diversity of Phages Infecting Probiotic Strains of *Lactobacillus paracasei*. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(1):95-105.
107. Jones JL, Anderson JM, Phuah CL, Fox EJ, Selmaj K, Margolin D, et al. Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity. *Brain.* 2010;133(Pt 8):2232-47.
108. Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, et al. Alemtuzumab more effective than interferon beta-1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology.* 2012;78(14):1069-78.
109. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, et al. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2012;380(9856):1819-28.
110. Huang B, Wang QT, Song SS, Wu YJ, Ma YK, Zhang LL, et al. Combined use of etanercept and MTX restores CD4(+)/CD8(+) ratio and Tregs in spleen and thymus in collagen-induced arthritis. *Inflamm Res.* 2012;61(11):1229-39.
111. Hartung HP, Gonsette R, Konig N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet.* 2002;360(9350):2018-25.
112. Eckstein C, Bhatti MT. Currently approved and emerging oral therapies in multiple sclerosis: An update for the ophthalmologist. *Surv Ophthalmol.* 2016;61(3):318-32.
113. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. *BMJ.* 2016;354:i3518.

114. Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL. Ocrelizumab and Other CD20(+) B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017;14(4):835-41.
115. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. 1980;125(4):1678-85.
116. Weber MS, Prod'homme T, Patarroyo JC, Molnarfi N, Karnezis T, Lehmann-Horn K, et al. B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol*. 2010;68(3):369-83.
117. Cross AH, Stark JL, Lauber J, Ramsbottom MJ, Lyons JA. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2006;180(1-2):63-70.
118. Fujimoto M, Fujimoto Y, Poe JC, Jansen PJ, Lowell CA, DeFranco AL, et al. CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. *Immunity*. 2000;13(1):47-57.
119. Yazawa N, Hamaguchi Y, Poe JC, Tedder TF. Immunotherapy using unconjugated CD19 monoclonal antibodies in animal models for B lymphocyte malignancies and autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(42):15178-83.
120. Chen D, Blazek M, Ireland S, Ortega S, Kong X, Meeuwissen A, et al. Single dose of glycoengineered anti-CD19 antibody (MEDI551) disrupts experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting pathogenic adaptive immune responses in the bone marrow and spinal cord while preserving peripheral regulatory mechanisms. *J Immunol*. 2014;193(10):4823-32.
121. Gourraud PA, Gilson L, Girard M, Peschanski M. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic "haplobank" of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*. 2012;30(2):180-6.
122. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*. 2007;28(1):5-11.
123. Dolei A, Garson JA, Arru G, Clerici M, Germi R, Marche PN, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus and related human endogenous retrovirus-W in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2014;266(1-2):87-8.
124. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*. 2000;321(7258):424.
125. Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*. 2012;93(1):1-10.
126. Romagnani S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res*. 1991;21(2):152-8.

127. Murphy KM, Ouyang W, Szabo SJ, Jacobson NG, Guler ML, Gorham JD, et al. T helper differentiation proceeds through Stat1-dependent, Stat4-dependent and Stat4-independent phases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;238:13-26.
128. O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol*. 2000;10(12):542-50.
129. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233-40.
130. Hoe E, Anderson J, Nathanielsz J, Toh ZQ, Marimla R, Balloch A, et al. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiol Immunol*. 2017;61(2):49-56.
131. Montes M, Zhang X, Berthelot L, Laplaud DA, Brouard S, Jin J, et al. Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin Immunol*. 2009;130(2):133-44.
132. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007;13(10):1173-5.
133. Mehling M, Lindberg R, Raulf F, Kuhle J, Hess C, Kappos L, et al. Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;75(5):403-10.
134. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*. 2011;12(6):568-75.
135. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2008;172(1):146-55.
136. Nakamura K, Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tamura T. Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production. *Infect Immun*. 1993;61(1):64-70.
137. Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Muller G, Yamauchi H, Kurimoto M, et al. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol*. 1998;28(10):3231-9.
138. Chandrasekar B, Patel DN, Mummidi S, Kim JW, Clark RA, Valente AJ. Interleukin-18 suppresses adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes via a novel signal transduction pathway involving ERK1/2-dependent NFATc4 phosphorylation. *J Biol Chem*. 2008;283(7):4200-9.
139. Nicoletti F, Di Marco R, Mangano K, Patti F, Reggio E, Nicoletti A, et al. Increased serum levels of interleukin-18 in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2001;57(2):342-4.

140. Huang WX, Huang P, Hillert J. Increased expression of caspase-1 and interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2004;10(5):482-7.
141. Karni A, Koldzic DN, Bharanidharan P, Khoury SJ, Weiner HL. IL-18 is linked to raised IFN-gamma in multiple sclerosis and is induced by activated CD4(+) T cells via CD40-CD40 ligand interactions. *J Neuroimmunol*. 2002;125(1-2):134-40.
142. Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, Li X, Lasota J, LaForgia S, et al. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics*. 1992;14(1):59-62.
143. Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006;54(1):15-24.
144. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*. 2006;27(1):17-23.
145. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1910-4.
146. Balashov KE, Smith DR, Khoury SJ, Hafler DA, Weiner HL. Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(2):599-603.
147. Trembleau S, Germann T, Gately MK, Adorini L. The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today*. 1995;16(8):383-6.
148. Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med*. 1995;181(1):381-6.
149. Fassbender K, Ragooschke A, Rossol S, Schwartz A, Mielke O, Paulig A, et al. Increased release of interleukin-12p40 in MS: association with intracerebral inflammation. *Neurology*. 1998;51(3):753-8.
150. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571-611.
151. Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(4).
152. Ottum PA, Arellano G, Reyes LI, Iruretagoyena M, Naves R. Opposing Roles of Interferon-Gamma on Cells of the Central Nervous System in Autoimmune Neuroinflammation. *Front Immunol*. 2015;6:539.

153. Olsson T, Sun J, Hillert J, Hojberg B, Ekre HP, Andersson G, et al. Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 1992;22(4):1083-7.
154. Dettke M, Scheidt P, Prange H, Kirchner H. Correlation between interferon production and clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Clin Immunol.* 1997;17(4):293-300.
155. Kantarci OH, Goris A, Hebrink DD, Heggarty S, Cunningham S, Alloza I, et al. IFNG polymorphisms are associated with gender differences in susceptibility to multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2005;6(2):153-61.
156. Aloisi F, Serafini B, Adorini L. Glia-T cell dialogue. *J Neuroimmunol.* 2000;107(2):111-7.
157. Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, et al. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine.* 1997;9(11):794-800.
158. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology.* 2010;129(3):311-21.
159. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13(2):139-45.
160. Durelli L, Barbero P, Cucci A, Ferrero B, Ricci A, Contessa G, et al. Neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with 375 micrograms interferon-beta-1b. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(4):387-97.
161. Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2008;63(1):16-25.
162. Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, Awasthi A, Dardalhon VA, Galileos G, et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47):18460-5.
163. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med.* 2012;209(5):1001-10.
164. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007;130(Pt 4):1089-104.
165. Beltran E, Obermeier B, Moser M, Coret F, Simo-Castello M, Bosca I, et al. Intrathecal somatic hypermutation of IgM in multiple sclerosis and neuroinflammation. *Brain.* 2014;137(Pt 10):2703-14.

166. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*. 2012;491(7423):264-8.
167. Yang Q, Goding SR, Hokland ME, Basse PH. Antitumor activity of NK cells. *Immunol Res*. 2006;36(1-3):13-25.
168. Kaur G, Trowsdale J, Fugger L. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *Brain*. 2013;136(Pt 9):2657-76.
169. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-10.
170. Oberg L, Johansson S, Michaelsson J, Tomasello E, Vivier E, Karre K, et al. Loss or mismatch of MHC class I is sufficient to trigger NK cell-mediated rejection of resting lymphocytes in vivo - role of KARAP/DAP12-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol*. 2004;34(6):1646-53.
171. Babic M, Romagnani C. The Role of Natural Killer Group 2, Member D in Chronic Inflammation and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2018;9:1219.
172. Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2005;163(1-2):24-30.
173. Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, et al. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J*. 2006;20(7):896-905.
174. Winkler-Pickett R, Young HA, Cherry JM, Diehl J, Wine J, Back T, et al. In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *J Immunol*. 2008;180(7):4495-506.
175. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
176. Illes Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol*. 2000;164(8):4375-81.
177. Gigli G, Caielli S, Cutuli D, Falcone M. Innate immunity modulates autoimmunity: type 1 interferon-beta treatment in multiple sclerosis promotes growth and function of regulatory invariant natural killer T cells through dendritic cell maturation. *Immunology*. 2007;122(3):409-17.
178. Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ*. 2010;51:127-47.

179. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC, Kumar V. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med*. 2004;199(7):947-57.
180. Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev*. 2014;259(1):231-44.
181. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA. Suppressor T cells. *J Immunol*. 1972;108(3):586-90.
182. Sakaguchi M, Kato H, Nishiyori A, Sagawa K, Itoh K. Characterization of CD4⁺ T helper cells in patients with Kawasaki disease (KD): preferential production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by V beta 2- or V beta 8- CD4⁺ T helper cells. *Clin Exp Immunol*. 1995;99(2):276-82.
183. Saverino D, Simone R, Bagnasco M, Pesce G. The soluble CTLA-4 receptor and its role in autoimmune diseases: an update. *Auto Immun Highlights*. 2010;1(2):73-81.
184. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.
185. Devaud C, Darcy PK, Kershaw MH. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(9):869-76.
186. Pathak M, Sharma P, Sharma A, Verma M, Srivastava M, Misra-Bhattacharya S. Regulatory T-cell neutralization in mice during filariasis helps in parasite clearance by enhancing T helper type 17-mediated pro-inflammatory response. *Immunology*. 2016;147(2):190-203.
187. Korn T, Anderson AC, Bettelli E, Oukka M. The dynamics of effector T cells and Foxp3⁺ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2007;191(1-2):51-60.
188. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(1):1-11.
189. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P. Natural naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol*. 2008;180(9):6411-20.
190. Astier AL, Hafler DA. Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007;191(1-2):70-8.
191. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002;3(10):944-50.

192. Lee KM, Stott RT, Zhao G, SooHoo J, Xiong W, Lian MM, et al. TGF-beta-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1728-36.
193. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015;42(4):607-12.
194. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2006;126(1):15-24.
195. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder TF. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther*. 2013;15 Suppl 1:S1.
196. Han J, Sun L, Fan X, Wang Z, Cheng Y, Zhu J, et al. Role of regulatory b cells in neuroimmunologic disorders. *J Neurosci Res*. 2016;94(8):693-701.
197. Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, et al. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol*. 2011;239(1-2):80-6.
198. Hirotani M, Niino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Yabe I, Hamada S, et al. Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010;221(1-2):95-100.
199. Michel L, Chesneau M, Manceau P, Genty A, Garcia A, Salou M, et al. Unaltered regulatory B-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2014;155(2):198-208.
200. Habib J, Deng J, Lava N, Tyor W, Galipeau J. Blood B Cell and Regulatory Subset Content in Multiple Sclerosis Patients. *J Mult Scler (Foster City)*. 2015;2(2).
201. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(2):232-60 ; second page, table of contents.
202. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(3):C539-48.
203. Greer ND. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2006;19(2):155-61.
204. Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, et al. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):14014-9.

205. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Donhofer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem.* 2014;395(5):559-75.
206. Jenner L, Starosta AL, Terry DS, Mikolajka A, Filonava L, Yusupov M, et al. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(10):3812-6.
207. De Laurentiis EI, Mercier E, Wieden HJ. The C-terminal Helix of *Pseudomonas aeruginosa* Elongation Factor Ts Tunes EF-Tu Dynamics to Modulate Nucleotide Exchange. *J Biol Chem.* 2016;291(44):23136-48.
208. Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother.* 1992;29(3):245-77.
209. Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1241:17-32.
210. Loffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J.* 2011;38(1):191-208.
211. Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(2):258-65.
212. Vernillo AT, Rifkin BR. Effects of tetracyclines on bone metabolism. *Adv Dent Res.* 1998;12(2):56-62.
213. Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):256-65.
214. Saivin S, Houin G. Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. *Clin Pharmacokinet.* 1988;15(6):355-66.
215. Campistron G, Coulais Y, Caillard C, Mosser J, Pontagnier H, Houin G. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in humans. *Arzneimittelforschung.* 1986;36(11):1705-7.
216. Nelis HJ, De Leenheer AP. Metabolism of minocycline in humans. *Drug Metab Dispos.* 1982;10(2):142-6.
217. Macdonald H, Kelly RG, Allen ES, Noble JF, Kanegis LA. Pharmacokinetic studies on minocycline in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1973;14(5):852-61.
218. Wood MJ, Farrell W, Kattan S, Williams JD. Activity of minocycline and tetracycline against respiratory pathogens related to blood levels. *J Antimicrob Chemother.* 1975;1(3):323-31.
219. Skidmore R, Kovach R, Walker C, Thomas J, Bradshaw M, Leyden J, et al. Effects of subantimicrobial-dose doxycycline in the treatment of moderate acne. *Arch Dermatol.* 2003;139(4):459-64.

220. Al-Mofarreh MA, Al Mofleh IA. Esophageal ulceration complicating doxycycline therapy. *World J Gastroenterol*. 2003;9(3):609-11.
221. Yong CK, Prendiville J, Peacock DL, Wong LT, Davidson AG. An unusual presentation of doxycycline-induced photosensitivity. *Pediatrics*. 2000;106(1):E13.
222. Smith K, Leyden JJ. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. *Clin Ther*. 2005;27(9):1329-42.
223. Shapiro LE, Knowles SR, Shear NH. Comparative safety of tetracycline, minocycline, and doxycycline. *Arch Dermatol*. 1997;133(10):1224-30.
224. Gough A, Chapman S, Wagstaff K, Emery P, Elias E. Minocycline induced autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus-like syndrome. *BMJ*. 1996;312(7024):169-72.
225. Shepherd J. Severe complication of a commonly prescribed drug: minocycline-induced lupus. *J Am Board Fam Pract*. 2002;15(3):239-41.
226. Urban TJ, Nicoletti P, Chalasani N, Serrano J, Stolz A, Daly AK, et al. Minocycline hepatotoxicity: Clinical characterization and identification of HLA-B *35:02 as a risk factor. *J Hepatol*. 2017;67(1):137-44.
227. Grosshans E, Belaich S, Meynadier J, Alirezai M, Thomas L. A comparison of the efficacy and safety of lymecycline and minocycline in patients with moderately severe acne vulgaris. *Eur J Dermatol*. 1998;8(3):161-6.
228. Golub L, Greenwald R, Ramamurthy N, Zucker S, Ramsammy L, McNamara T. Tetracyclines (TCs) inhibit matrix metalloproteinases (MMPs): in vivo effects in arthritic and diabetic rats and new in vitro studies. *Matrix Suppl*. 1992;1:315-6.
229. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol*. 2013;169(2):337-52.
230. Korting HC, Schollmann C. Tetracycline actions relevant to rosacea treatment. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009;22(6):287-94.
231. Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem*. 2005;94(3):819-27.
232. Pruzanski W, Greenwald RA, Street IP, Laliberte F, Stefanski E, Vadas P. Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A2 by minocycline and doxycycline. *Biochem Pharmacol*. 1992;44(6):1165-70.
233. Gabler WL, Tsukuda N. The influence of divalent cations and doxycycline on iodoacetamide-inhibitable leukocyte adherence. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1991;74(2):131-40.

234. Webster GF, Toso SM, Hegemann L. Inhibition of a model of in vitro granuloma formation by tetracyclines and ciprofloxacin. Involvement of protein kinase C. *Arch Dermatol.* 1994;130(6):748-52.
235. Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med.* 2000;6(7):797-801.
236. Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, et al. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(18):10483-7.
237. Corbacella E, Lanzoni I, Ding D, Previati M, Salvi R. Minocycline attenuates gentamicin induced hair cell loss in neonatal cochlear cultures. *Hear Res.* 2004;197(1-2):11-8.
238. Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(25):9685-90.
239. Ishikawa C, Tsuda T, Konishi H, Nakagawa N, Yamanishi K. Tetracyclines modulate protease-activated receptor 2-mediated proinflammatory reactions in epidermal keratinocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):1760-5.
240. Stefansson K, Brattsand M, Roosterman D, Kempkes C, Bocheva G, Steinhoff M, et al. Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *J Invest Dermatol.* 2008;128(1):18-25.
241. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15769-74.
242. Metz LM, Zhang Y, Yeung M, Patry DG, Bell RB, Stoian CA, et al. Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2004;55(5):756.
243. Tomas-Camardiel M, Rite I, Herrera AJ, de Pablos RM, Cano J, Machado A, et al. Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiol Dis.* 2004;16(1):190-201.
244. Nikodemova M, Duncan ID, Watters JJ. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J Neurochem.* 2006;96(2):314-23.

245. Bahrami Z, Firouzi M, Hashemi-Monfared A, Zahednasab H, Harirchian MH. The effect of minocycline on indolamine 2, 3 dioxygenase expression and the levels of kynurenic acid and quinolinic acid in LPS-activated primary rat microglia. *Cytokine*. 2018;107:125-9.
246. Dai S, Hua Y, Keep RF, Novakovic N, Fei Z, Xi G. Minocycline attenuates brain injury and iron overload after intracerebral hemorrhage in aged female rats. *Neurobiol Dis*. 2018.
247. Hersch S, Fink K, Vonsattel JP, Friedlander RM. Minocycline is protective in a mouse model of Huntington's disease. *Ann Neurol*. 2003;54(6):841; author reply 2-3.
248. Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14669-74.
249. Sahoo AK, Dandapat J, Dash UC, Kanhar S. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol*. 2018;215:42-73.
250. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*. 2002;417(6884):74-8.
251. Van Den Bosch L, Tilkin P, Lemmens G, Robberecht W. Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS. *Neuroreport*. 2002;13(8):1067-70.
252. Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain*. 2002;125(Pt 6):1297-308.
253. Popovic N, Schubart A, Goetz BD, Zhang SC, Linington C, Duncan ID. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol*. 2002;51(2):215-23.
254. Nikodemova M, Watters JJ, Jackson SJ, Yang SK, Duncan ID. Minocycline down-regulates MHC II expression in microglia and macrophages through inhibition of IRF-1 and protein kinase C (PKC)alpha/betaII. *J Biol Chem*. 2007;282(20):15208-16.
255. Luccarini I, Ballerini C, Biagioli T, Biamonte F, Bellucci A, Rosi MC, et al. Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE. *Exp Neurol*. 2008;211(1):214-26.
256. Giuliani F, Metz LM, Wilson T, Fan Y, Bar-Or A, Yong VW. Additive effect of the combination of glatiramer acetate and minocycline in a model of MS. *J Neuroimmunol*. 2005;158(1-2):213-21.
257. Giuliani F, Fu SA, Metz LM, Yong VW. Effective combination of minocycline and interferon-beta in a model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2005;165(1-2):83-91.

258. Kalish RS, Koujak S. Minocycline inhibits antigen processing for presentation to human T cells: additive inhibition with chloroquine at therapeutic concentrations. *Clin Immunol.* 2004;113(3):270-7.
259. Kloppenburg M, Verweij CL, Miltenburg AM, Verhoeven AJ, Daha MR, Dijkmans BA, et al. The influence of tetracyclines on T cell activation. *Clin Exp Immunol.* 1995;102(3):635-41.
260. Kloppenburg M, Brinkman BM, de Rooij-Dijk HH, Miltenburg AM, Daha MR, Breedveld FC, et al. The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(4):934-40.
261. Scholz R, Sobotka M, Caramoy A, Stempffl T, Moehle C, Langmann T. Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J Neuroinflammation.* 2015;12:209.
262. Enose-Akahata Y, Matsuura E, Tanaka Y, Oh U, Jacobson S. Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology.* 2012;9:16.
263. Ganapamo F, Dennis VA, Philipp MT. CD19(+) cells produce IFN-gamma in mice infected with *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Immunol.* 2001;31(12):3460-8.
264. Bernardino AL, Kaushal D, Philipp MT. The antibiotics doxycycline and minocycline inhibit the inflammatory responses to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1379-88.
265. Smith-Norowitz TA, Weaver D, Norowitz YM, Hammerschlag MR, Joks R, Durkin HG, et al. Doxycycline suppresses *Chlamydia pneumoniae* induced interferon-gamma responses in peripheral blood mononuclear cells in children with allergic asthma. *J Infect Chemother.* 2018;24(6):470-5.
266. Metz LM, Li DKB, Traboulsee AL, Duquette P, Eliasziw M, Cerchiaro G, et al. Trial of Minocycline in a Clinically Isolated Syndrome of Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(22):2122-33.
267. Krakauer T, Buckley M. Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(11):3630-3.
268. Di Caprio R, Lembo S, Di Costanzo L, Balato A, Monfrecola G. Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: an in vitro study. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:329418.
269. Robinson PJ. Differential stimulation of protein kinase C activity by phorbol ester or calcium/phosphatidylserine in vitro and in intact synaptosomes. *J Biol Chem.* 1992;267(30):21637-44.

270. Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev.* 2005;203:38-47.
271. Valiante NM, Rengaraju M, Trinchieri G. Role of the production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) in the ability of B cell lines to stimulate T and NK cell proliferation. *Cell Immunol.* 1992;145(1):187-98.
272. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol.* 2015;27(10):479-86.
273. Qi Y, Yan B, Chen S, Chen H, Wang M, Jia R, et al. CpG oligodeoxynucleotide-specific goose TLR21 initiates an anti-viral immune response against NGVEV but not AIV strain H9N2 infection. *Immunobiology.* 2016;221(3):454-61.
274. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995;374(6522):546-9.
275. Gantner F, Hermann P, Nakashima K, Matsukawa S, Sakai K, Bacon KB. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol.* 2003;33(6):1576-85.
276. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.
277. Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell.* 1989;56(5):801-13.
278. Schuerwegh AJ, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry.* 2001;46(3):172-6.
279. Fazekas de St Groth B, Zhu E, Asad S, Lee L. Flow cytometric detection of human regulatory T cells. *Methods Mol Biol.* 2011;707:263-79.
280. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.* 2000;46(8 Pt 2):1221-9.
281. D'Angelo C, Reale M, Costantini E, Di Nicola M, Porfilio I, de Andres C, et al. Profiling of Canonical and Non-Traditional Cytokine Levels in Interferon-beta-Treated Relapsing-Remitting-Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol.* 2018;9:1240.
282. Podbielska M, O'Keeffe J, Hogan EL. Autoimmunity in multiple sclerosis: role of sphingolipids, invariant NKT cells and other immune elements in control of inflammation and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 2018;385:198-214.

283. McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity*. 2006;39(1):9-19.
284. Szeto GL, Pomerantz JL, Graham DR, Clements JE. Minocycline suppresses activation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in human CD4⁺ T cells. *J Biol Chem*. 2011;286(13):11275-82.
285. Alexander-Savino CV, Hayden MS, Richardson C, Zhao J, Poligone B. Doxycycline is an NF-kappaB inhibitor that induces apoptotic cell death in malignant T-cells. *Oncotarget*. 2016;7(46):75954-67.
286. Wang LL, Chen H, Huang K, Zheng L. Elevated histone acetylations in Muller cells contribute to inflammation: a novel inhibitory effect of minocycline. *Glia*. 2012;60(12):1896-905.
287. Wang X, Bishop KA, Hegde S, Rodenkirch LA, Pike JW, Gumperz JE. Human invariant natural killer T cells acquire transient innate responsiveness via histone H4 acetylation induced by weak TCR stimulation. *J Exp Med*. 2012;209(5):987-1000.
288. Miyake T, Satoh T, Kato H, Matsushita K, Kumagai Y, Vandebon A, et al. IkappaBzeta is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(41):17680-5.
289. Thomas H, Jager M, Mauel K, Brandau S, Lask S, Flohe SB. Interaction with mesenchymal stem cells provokes natural killer cells for enhanced IL-12/IL-18-induced interferon-gamma secretion. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:143463.
290. Guerra AD, Rose WE, Hematti P, Kao WJ. Minocycline modulates NFkappaB phosphorylation and enhances antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* in mesenchymal stromal/stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):171.
291. Hou Y, Heon Ryu C, Jun JA, Kim SM, Jeong CH, Jeun SS. Interferon beta-secreting mesenchymal stem cells combined with minocycline attenuate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2014;274(1-2):20-7.
292. Nikodemova M, Lee J, Fabry Z, Duncan ID. Minocycline attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in rats by reducing T cell infiltration into the spinal cord. *J Neuroimmunol*. 2010;219(1-2):33-7.
293. Yi C, Zhang Z, Wang W, Zug C, Schluesener HJ, Zhang Z. Doxycycline attenuates peripheral inflammation in rat experimental autoimmune neuritis. *Neurochem Res*. 2011;36(11):1984-90.
294. Huang Y, Li R, Chen X, Zhuo Y, Jin R, Qian XP, et al. Doxycycline up-regulates the expression of IL-6 and GM-CSF via MAPK/ERK and NF-kappaB pathways in mouse thymic epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(9):1143-9.

295. Schroder M, Meisel C, Buhl K, Profanter N, Sievert N, Volk HD, et al. Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J Immunol.* 2003;170(10):5260-7.
296. Kim N, Park CS, Im SA, Kim JW, Lee JH, Park YJ, et al. Minocycline promotes the generation of dendritic cells with regulatory properties. *Oncotarget.* 2016;7(33):52818-31.
297. Bell CJ, Sun Y, Nowak UM, Clark J, Howlett S, Pekalski ML, et al. Sustained in vivo signaling by long-lived IL-2 induces prolonged increases of regulatory T cells. *J Autoimmun.* 2015;56:66-80.
298. Kuzin, II, Snyder JE, Uguine GD, Wu D, Lee S, Bushnell T, Jr., et al. Tetracyclines inhibit activated B cell function. *Int Immunol.* 2001;13(7):921-31.